

Aus der
Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Die Trinukleotid-Expansion des Gens für zelluläre Glutathion-Peroxidase bei Patienten
mit sporadischer amyotropher Lateralsklerose**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Jan M. Hille
aus Erlangen

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Stephan Mundlos

2. PD Dr. Thomas Meyer

3. PD Dr. Dietmar Bengel

Datum der Promotion: 22.09.2003

Zusammenfassung: Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie der sporadischen amyotrophen Lateralsklerose (sALS) weiterhin unbekannt. Zahlreiche Anzeichen deuten allerdings auf eine Mitbeteiligung von oxidativem Streß an der Pathogenese der sALS hin. So fand sich eine verminderte Aktivität der zellulären Glutathion-Peroxidase (GPX-1), eines als Radikalfänger fungierenden Enzyms, in den *Gyrus praecentrales* bei sALS-Patienten. Zusätzliche Studien fanden eine Trinukleotid-Expansion des GGG-repeats im 1. Exon des für die GPX-1 kodierenden Gens. Da Trinukleotid-Expansionen bei einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Kennedy-Syndrom und der spinocerebellären Ataxie nachgewiesen werden konnten, war das Ziel dieser Arbeit, eine fragliche Mitbeteiligung dieser Trinukleotid-Expansion der GPX-1 an der Pathogenese der sALS zu klären.

Nach Etablierung der Methode bestehend aus einer Kombination von Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) zeigte sich, dass der Genotyp 4*5 bei einer Gruppe von 231 sALS-Patienten signifikant häufiger vertreten war, wohingegen der Genotyp 5*6 in der Kontrollgruppe signifikant überrepräsentiert war. Im Vergleich zu bisher veröffentlichten Ergebnissen ließ sich der Genotyp 4*4 in der Kontrollgruppe signifikant häufiger nachweisen. Ursache hierfür könnte – neben einem tatsächlich erhöhten Risiko, an sALS zu erkranken – der Zusammenhang mit einem C/T-Polymorphismus der GPX-1 sein, der zu einem Austausch von Prolin zu Leucin führt. Die für Leucin kodierende Variante tritt hierbei nur zusammen mit 5 GCG-repeats auf, während die für Prolin kodierende Variante mit dem Auftreten von 4 und 6 GCG-repeats korreliert.

Amyotrophe Lateralsklerose, Glutathion-Peroxidase, Trinukleotid-Expansion, Polymorphismus

Abstract: In spite of intensive research efforts the ethiology of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS) remains unknown. Various indices indeed suggest an involvement of oxidative stress in the pathogenesis of sALS. Thus a decreased activity of the cellular glutathione peroxidase (GPX-1) in gyrus praecentrales of sALS patients could be detected, an enzym strongly participating in the clearance of free radicals. Additional studies uncovered a trinucleotid expansion of a GCG repeat in the 1st exon of the gene coding for GPX-1. Such trinucleotid expansions play a major role in a variety of neurodegenerative disorders like the Kennedy Syndrom and spinal-cerebellary ataxia. Goal of this work was to disclose a possible involvement of the GCG expansion in the pathogenesis of sALS. Through the successful establishment of the methodology consisting of a combination of polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) we could demonstrate a significant decrease of the genotype 4*5 in a group of 231 sALS patients, whereas the genotype 5*6 was overrepresented in the control group. Compared to hitherto publications we detected an increased occurrence of the 4*4 genotype in the control group. Besides an effective increased risk to contract sALS, the distribution of the GCG-repeat expansion could originate from another C/T polymorphism of GPX-1-gene leading to a substitution of proline with leucine. The leucine coding mutation occurs together with 5 GCG repeats, whereas the proline coding mutant correlates with 4 and 6 GCG-repeats.

Amyotrophic lateral sclerosis, glutathione-peroxidase, trinucleotid expansion, polymorphism

Diese Arbeit ist von ganzem Herzen meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1	Einleitung	12
1.1	Definition der amyotrophen Lateralsklerose (ALS).....	12
1.2	Geschichte der ALS	12
1.3	ALS-Formen.....	12
1.3.1	Klassische und familiäre Form.....	13
1.3.2	Bulbär- und Pseudobulbärparalyse.....	14
1.3.3	ALS-Parkinson-Demenz-Komplex	14
1.3.4	ALS-PUMNS	14
1.3.5	Primär spastische ALS	15
1.4	Epidemiologie der ALS.....	15
1.5	Verlauf der ALS	16
1.6	Ätiopathogenese der ALS	16
1.6.1	Autoimmunphänomene	16
1.6.2	Neurotrope Viren.....	17
1.6.3	Exogene Neurotoxine.....	17
1.6.4	Molekularbiologische Ursachen.....	18
1.6.4.1	Trophische Faktoren.....	18
1.6.4.2	Glutamat und andere Neurotransmitter	18
1.6.4.3	Oxidativer Streß	20
1.6.4.4	Cu/Zn-Superoxid-Dismutase.....	23

1.6.4.5	Peroxynitrit.....	24
1.6.4.6	Glutathion.....	25
1.6.4.7	Glutathion-Peroxidase.....	26
1.6.4.8	Sonstige genetische Ursachen	28
1.6.4.9	Trinukleotid-Expansion.....	29
1.7	Herleitung der Fragestellung.....	30
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Material	33
2.1.1	Proben.....	33
2.1.2	DNA-Extraktion.....	33
2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.1.4	Polyacrylamidgele.....	34
2.1.5	Gelelektrophorese.....	35
2.1.6	Silberfärbung.....	35
2.1.7	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus	36
2.1.8	Sequenzierung	36
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Proben.....	38
2.2.2	DNA-Extraktion.....	38
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.2.4	Polyacrylamidgele.....	43
2.2.5	Gelelektrophorese.....	45

2.2.6	Silbernitratfärbung	46
2.2.7	Reamplifikation des PCR-Produktes.....	47
2.2.8	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus	48
2.2.9	Sequenzierung	50
3	Ergebnisse	54
3.1	Methodenetablierung.....	54
3.1.1	Primerwahl	54
3.1.2	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus	57
3.1.3	Geloptimierung.....	59
3.1.4	Sequenzierung	62
3.2	Darstellung der optimierten Methode	63
3.3	V Versuchsergebnisse	64
3.3.1	Patientenproben.....	64
3.3.2	Kontrollgruppe	66
3.3.3	Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen.....	67
3.3.4	Vergleich der Kontrollgruppe mit Literaturdaten	69
4	Diskussion	71
4.1	Methodenetablierung.....	71
4.2	Pathogenetische Bedeutung freier Radikale.....	73
4.3	Oxidativer Streß und Krankheiten.....	74
4.4	Trinukleotid-Expansion und Krankheiten.....	75
4.4.1	Krankheiten mit nicht-kodierenden Trinukleotid-Repeats.....	76

4.4.2	Krankheiten mit kodierenden Trinukleotid-Repeats	77
4.5	Schädigungsmechanismen der Trinukleotid-Expansionen	77
4.6	Interpretation	80
4.7	Ausblick	85
5	Zusammenfassung.....	86
6	Literaturverzeichnis.....	88
7	Danksagung	97
8	Lebenslauf.....	98

Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampere
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar
C	Celsius
C	Cytosin
CNTF	ciliary derived neurotrophic factor
CTP	Cytosin-Triphosphat
DNA	Dexoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
et al.	und andere
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
fALS	familiäre amyotrophe Lateralsklerose
G	Guanin
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GPX	Glutathion-Peroxidase
h	Stunde
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
HTLV	human-T-cell-leucaemia-virus
i.m.	intramuskulär
l	Liter
M	Mol
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	Messenger-RNA
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffoxid
ONOO	Peroxynitrit
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzungen

RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
sALS	sporadische amyotrophe Lateralsklerose
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannt
T	Thymin
tRNA	Transmitter-RNA
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Definition der amyotrophen Lateralsklerose (ALS)

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurologische Erkrankung, die durch eine fortschreitende Degeneration der ersten und zweiten Motoneurone gekennzeichnet ist. Klinisch äußert sie sich durch das Auftreten von Paresen in Folge von Muskelatrophie, durch Spastiken und Pyramidenbahnzeichen. Sie ist mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 55 Jahren eine Erkrankung des mittleren und höheren Lebensalters und endet nach ca. zwei bis fünf Jahren – meist bedingt durch terminale Ateminsuffizienz – letal¹. Die Prävalenz liegt bei 4-8, die Inzidenz bei 1-3 pro 100.000 Menschen.

1.2 Geschichte der ALS

Bereits 1850 wurden durch Aran elf Patienten mit dem Bild einer spinalen Muskelatrophie beschrieben, wobei drei von ihnen gesteigerte Eigenreflexe aufwiesen, so daß es sich hierbei um die Erstbeschreibung der ALS handeln könnte. Charcot schließlich wies 1869 die Beteiligung der Pyramidenbahn nach und prägte die klinisch-pathologische Bezeichnung „amyotrophe Lateralsklerose“². Daher wurde für dieses Krankheitsbild in der nachfolgenden Literatur häufig die Bezeichnung „Charcot-Krankheit“ verwendet.

1.3 ALS-Formen

Eine exakte Krankheitsbezeichnung und Definition war bei der ALS – insbesondere bei älteren Studien, die meist nur den Ausdruck *motor neuron diseases* gebrauchten¹ – nicht immer gegeben, so daß sowohl unterschiedliche Formen der ALS untereinander, als auch die ALS zu anderen Krankheitsbildern abgegrenzt werden müssen.

Um eine einheitliche Einteilung der ALS zu ermöglichen, einigte man sich 1990 auf sog. El Escorial Kriterien, die 1998 noch modifiziert wurden. Hiernach ist die ALS eine primäre progressive Degeneration der 1. und 2. Motoneuronen und wird nach den klinischen Symptomen in verdächtige, mögliche, wahrscheinliche und sichere ALS eingeteilt¹¹¹. Daneben werden die

Symptome noch nach deren Ursprung in 4 unterschiedliche Regionen des zentralen Nervensystems eingeteilt: bulbär, cervical, thorakal und lumbosakral¹¹².

1.3.1 Klassische und familiäre Form

Die klassische Form der ALS (sALS) tritt mit bisher unbekannter Ätiologie sporadisch auf und macht in Europa ungefähr 90-95% der ALS-Fälle aus. Nur 5-10% der Fälle betreffen die familiäre, autosomal dominant vererbte ALS¹ (fALS), wobei sich beide Erkrankungen im klinischen Verlauf gleichen. Im Vordergrund stehen hier stets die progredienten Paresen, die nach anfangs meist noch fokalen Atrophien grundsätzlich alle quergestreiften Muskeln betreffen können mit Ausnahme der äußeren Augenmuskeln und der Sphinkteren von Blase und Mastdarm. Im Verlauf der Erkrankung breiten sich die Paresen mit remissionsloser Progredienz auf alle Muskelgruppen aus bis hin zur Tetraplegie.

Erste Symptome können eine Ungeschicklichkeit der Hände, Störungen der Feinmotorik oder eine Verschmächtigung der Handmuskulatur sein. Die Atrophien entwickeln sich vorwiegend distal an den Extremitäten und zwar zu 50% an den Armen und zu 50% einseitig. In je 25-30% beginnt die Erkrankung an den unteren Extremitäten oder mit bulbären Symptomen, vor allem der mittleren und kaudalen Hirnnervenkerne (V, VII, IX, X, XI, XII). Hierdurch kommt es zu einer Schwäche der Kau- und Schluckmuskulatur, zur Zungenatrophie und zu Faszikulationen. Weitere Merkmale einer zentralen Beteiligung sind pathologisches Weinen, Lachen und Gähnen, das auf eine Enthemmung von Hirnstammfunktionen und kortikaler bzw. limbischer Strukturen zurückgeführt wird. Sensible Funktionen bleiben ausgespart. Allgemeinsymptome im Frühstadium können Parästhesien, Missempfindungen, rasche Ermüdbarkeit, Muskelkrämpfe und Faszikulationen sein. Hierbei muß berücksichtigt werden, dass durch die kompensatorische kollaterale Regeneration Paresen erst nach einem Untergang von über 50% der Vorderhornzellen auftreten⁸⁶.

Ein kleiner Teil der Patienten zeigt eine Mitbeteiligung des autonomen Nervensystems in Form von Blasenstörungen.

Sensibilitätsstörungen gelten als Ausschlusskriterium einer ALS, wobei zu berücksichtigen ist, dass zu Beginn der Erkrankung einige Patienten unter Dys- und Parästhesien leiden, die im Zusammenhang mit Krämpfen oder Faszikulationen auftreten.

Die intellektuellen Fähigkeiten bleiben während des gesamten Verlaufs der Erkrankung in der Regel unbeeinträchtigt. Hiervon abzugrenzen ist eine veränderte Affektlage mit starken

Stimmungsschwankungen sowie patholog. Lachen und Weinen, die vor allem bei Patienten mit bulbärer und pseudobulbärer Symptomatik auftreten.

Bettlägerige ALS-Patienten entwickeln bemerkenswerterweise nur selten Dekubitalgeschwüre, in ihren Hautbiopsien wurde eine veränderte Kollagenverteilung und –struktur gefunden¹.

1.3.2 Bulbär- und Pseudobulbärparalyse

Wenn sich der Krankheitsprozeß ausschließlich auf die motorischen Hirnnerven im unteren Hirnstamm beschränkt, verwendet man die Bezeichnung Bulbärparalyse. Hierbei stehen Paresen der unteren Hirnnervenkerne mit Folgen wie Dysarthrie, Aphonie, Störungen der Schluck- und Kaumuskulatur und Zungenatrophie im Vordergrund¹.

Sind ausschließlich supranukleäre Neurone betroffen, also die Bahnen, die die Hirnnervenkerne mit Großhirn und Stammganglien verbinden (*Tractus corticobulbaris*), ist die Bezeichnung Pseudobulbärparalyse zutreffend. Hierbei stehen Symptome wie Lähmungen der Gesichts-, Zungen-, Mund- und Rachenmuskulatur, Pyramidenbahnzeichen und Affektlabilität wie pathologisches Lachen oder Weinen im Vordergrund. Im Gegensatz zur Bulbärparalyse finden sich hierbei keine Zungenatrophie oder Faszikulationen der Zungenmuskulatur¹.

1.3.3 ALS-Parkinson-Demenz-Komplex

Im westpazifischen Raum (Marianeninseln, Kii in Japan und West-Neuguinea) wird ein spezieller ALS-Parkinson-Demenz-Komplex beobachtet, bei dem exogene Neurotoxine als Ursache angenommen werden.

1.3.4 ALS-PUMNS

Nicht in allen Fällen ist wie bei der klassischen Form der ALS das gemeinsame Betroffensein zentraler und peripherer Motoneurone evident. Wenn bei eindeutigen Zeichen einer Erkrankung der unteren Motoneurone die spastische Tonuserhöhung, Kloni und Zeichen nach Babinski fehlen, die Eigenreflexe jedoch positiv oder lebhaft sind, wählt man die Bezeichnung ALS-PUMNS. PUMNS steht hierbei für probable upper motor neuron signs. Oft entwickeln sich erst im weiteren Krankheitsverlauf spastische Zeichen, so daß man dann von einer klassischen ALS sprechen kann. Es gibt jedoch auch Fälle, bei denen sich erst durch eine Autopsie Degenerationen des supranukleären Systems zeigen¹.

1.3.5 Primär spastische ALS

Die spastische Spinalparalyse oder die primäre Lateralsklerose gehören nicht zur ALS, jedoch gibt es primär spastische Formen der ALS, die zunächst klinisch keine Beteiligung des unteren Motoneurons erkennen lassen. Im weiteren Verlauf kann es – wie bei der ALS-PUMNS – jedoch zum Übergang in die klassische Form der ALS kommen¹.

1.4 Epidemiologie der ALS

Der Gruppendurchschnittswert der Inzidenz beträgt 1,06 auf 100 000 Einwohner (Streubreite 0,4 – 2,4) und der Prävalenz 4,3 auf 100 000 Einwohner (Streubreite 1,6 – 7,0)⁸³. Die Variationen der Inzidenz und Prävalenz sind in europäischen sowie nord- und mittelamerikanischen Staaten und in Israel erstaunlich groß. Ob die großen Unterschiede der Inzidenz reale Fakten oder eine unterschiedliche Qualität der epidemiologischen Datenerfassung darstellen, ist schwer zu beurteilen.

Fast alle epidemiologischen Untersuchungen in den Jahren 1966 bis 1991 weisen eine steigende jährliche altersadaptierte Todesrate aus⁸⁴. Hierbei ist nicht sicher, ob diese Zunahme Folge einer verbesserten Diagnostik und einer höheren Lebenserwartung ist, oder ob sich tatsächlich eine reale Zunahme der ALS-Inzidenz und –Mortalität zeigt.

Geschlechtsbezogen zeigt sich eine leichte Häufung der ALS-Fälle bei den Männern im Verhältnis von 1,6: 1.

Mögliche Risikofaktoren wurden von Currier und Conwill⁸⁵ bei 24 mono- und dizygoten Zwillingen untersucht, von denen jeweils einer an ALS erkrankt war. Hierbei zeigte sich eine signifikante Häufung von grippeartigen Erkrankungen und starker körperlicher Aktivität bei den ALS-erkrankten Zwillingen. Diese Ergebnisse konnten durch zahlreiche weitere Untersuchungen bestätigt werden, wobei sich in anderen Studien zusätzlich eine signifikante Häufung von Traumen (OP, Gewalt, Frakturen) zeigte. Eine neue Studie aus Stanford, USA mit 161 ALS-Patienten untersuchte den Zusammenhang zwischen Alkohol- bzw. Tabakkonsum und ALS und fand eine Verdoppelung des Krankheitsrisikos für ALS bei früheren Rauchern und sogar ein verdreifachtes Risiko bei aktiven Rauchern. Hinsichtlich des Alkoholkonsums fand sich keine Assoziation mit ALS³.

1.5 Verlauf der ALS

Die ALS betrifft meist das mittlere und höhere Lebensalter und führt meist nach einem progredienten Verlauf innerhalb von 2-5 Jahren zum Tode. In seltenen Fällen werden Verläufe von 10-20 Jahren beobachtet. Ebenso selten sind Jugendliche oder jüngere Erwachsene betroffen.

1.6 Ätiopathogenese der ALS

Bisher ist der ätiologische Mechanismus der ALS nur für einen kleinen Teil der ALS-Fälle - die familiäre Form - bekannt, worauf an späterer Stelle noch eingegangen wird. Sowohl bei der klassischen, sporadischen Form der ALS als auch bei der familiären Form der ALS gibt es jedoch eine Vielzahl von Hypothesen, die teilweise recht viele spekulative Elemente enthalten, hier aber trotzdem kurz erwähnt werden sollen.

1.6.1 Autoimmunphänomene

Krankheiten mit unbekannter Ätiologie werden schnell dem Bereich der Autoimmunkrankheiten zugeordnet, was sich auch bei der ALS durch teils widersprüchliche Berichte über das vermehrte Auftreten bestimmter HLA-Antigene zeigte, wie z.B. der Erhöhung von HLA BW35 bei der ALS auf Guam⁴. Eine Studie belegte, daß 21% der Verwandten von ALS-Patienten an einer Variante einer Autoimmunerkrankung leiden⁵.

Zusammenhänge zwischen motorischen Systemdegenerationen und ALS zeigen vor allem die Assoziationen mit monoklonalen Paraproteinämien⁸⁷ und mit mono- oder polyklonalen Antikörpern gegen das Myelin peripherer Nerven⁵ und Ganglioside wie GM-1⁴. Auch über einen Zusammenhang mit Lymphomen ist berichtet worden¹.

Eine andere Studie⁶ beobachtete bei sALS Antikörper gegen Ca-Kanäle, die die Funktionen dieser Kanäle in vitro und in vivo verändern können und durch Veränderung der intrazellulären Ca-Konzentration die Signalübertragung an der muskulären Endplatte stören können. Hierdurch kann es zu Zeichen einer sauerstoffbedingten Schädigung der Motoneurone kommen (Schwellung und Zerstörung des Golgi-Apparates). So können diese Antikörper eine Ca-abhängige Apoptose verursachen, wie sie in anderen Studien bei sALS beschrieben wurde^{7, 8}.

Wenn auch für eine Beteiligung einer autoimmunen Komponente an der Entstehung der ALS die Tatsache spricht, daß bei einigen Patienten nach immunsuppressiver Therapie oder Plasmapherese eine Besserung der Beschwerden eintrat⁴, so scheint doch die Ätiologie mit diesem Lösungsansatz nicht ausreichend erklärt zu sein.

1.6.2 Neurotrope Viren

Nach der Erforschung der Übertragbarkeit der Creutzfeld-Jakob-Krankheit gewann die Hypothese einer persistierenden Virusinfektion als Ursache der ALS an Bedeutung.

Vor allem Poliomyelitis-Viren wurde hierbei ein Einfluß zugeschrieben, da sie unter anderem auch Motoneurone befallen, bei Überlebenden einer Poliomyelitis ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen der Motoneurone vermutet wurde und in Neuronenkulturen persistierende Poliomyelitis-Infektionen nachgewiesen wurden⁴. Trotz alledem konnten diese Einflüsse bis heute nicht nur nicht bewiesen werden, sondern durch weitere Versuche eher noch entkräftet werden^{1,5}.

Als weitere Virusgruppe im Zusammenhang mit ALS wurde die Gruppe der Retroviren diskutiert, wobei besonderes Augenmerk auf das HTL-1-Virus (*human-T-cell-leucaemia-virus*) gelegt wurde, das sowohl T-Zell-Lymphome als auch die tropische spastische Paraparese verursachen kann¹. Allerdings konnte ein Zusammenhang zwischen HTLV-1-Virus – wie übrigens auch zwischen HIV- und sALS bisher nicht belegt werden.

1.6.3 Exogene Neurotoxine

Exogene Neurotoxine als Ursache konnten im Fall des ALS-Dementia-Komplex im Westpazifik nachgewiesen werden. Die Symptome traten durch den Verzehr der falschen Sagopalme (*Cycas circinalis*) auf, die das Glykosid Cycasin und das Glutamat analogon β -N-Methylamino-L-Alanin (L-BMAA) enthält, das am non-NMDA-Rezeptor von Glutamat bindet⁹.

Auch bei anderen ALS-ähnlichen Erkrankungen konnten exogene Neurotoxine als Verursacher gefunden werden. Der Neurolathyrismus tritt durch den Verzehr der Kichererbse auf, die β -N-Oxalamino-L-Alanin enthält, ebenfalls ein Glutamat analogon und Agonist am non-NMDA-Rezeptor¹⁰.

Bei dem sog. Neurocassavaismus, der durch falsche Zubereitung der bitteren Casava (*Manihot esculenta*) hervorgerufen wird, werden in der Pflanze enthaltene Cyanohydrine als toxische Substanzen der Atmungskette verantwortlich gemacht¹⁰.

1.6.4 Molekularbiologische Ursachen

Ein Schwerpunkt des aktuellen Interesses hinsichtlich der Ätiopathogenese der ALS liegt seit einiger Zeit auf der Suche nach endogenen Stoffwechselprodukten. Die Vermehrung von endogenen Stoffen bis hin zu einer toxischen Konzentration ist bei einigen akuten neurologischen Erkrankungen wie Insult, Epilepsie oder Schädel-Hirn-Trauma bereits nachgewiesen worden, mittlerweile wird eine solche Vermehrung auch als Ursache chronischer neurologischer Erkrankungen, insb. neurodegenerativer Erkrankungen vermutet¹¹.

1.6.4.1 Trophische Faktoren

Nach der Entdeckung, daß es sich bei dem *ciliary-derived-neurotrophic-factor* (CNTF) um einen spezifischen Wachstumsfaktor für Motoneurone handelt⁴, wurde die Hoffnung geweckt, daß eine Störung des CNTF motorische Systemdegenerationen im Sinne einer Apoptose verursachen könnte¹². Die Hoffnungen auf einen potenten Ansatz in dieser Richtung zerschlugen sich jedoch, als nachgewiesen wurde, daß CNTF einen pluripotenten Effekt aufweist¹. Aktuelle Forschungen suchen nach der Rolle anderer neuronaler Wachstumsfaktoren (NGF, BDNF und NT-3) und zusätzlicher Wachstumsfaktoren (GDNF, TGF- α , IGF-I), wobei eine abschließende Beurteilung hinsichtlich deren Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht möglich ist¹³.

1.6.4.2 Glutamat und andere Neurotransmitter

Glutamat gehört zu den exzitatorischen Aminosäuren, wird im präsynaptischen Neuron synthetisiert und ausgeschüttet und bindet am postsynaptischen Neuron an sog. NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren. Die Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt erfolgt entweder über ein sog. Re-uptake oder über Aufnahme in die Gliazelle und Abbau zu α -Ketoglutarat durch die Glutamat-Dehydrogenase¹.

Seit langem ist bekannt, daß bei ALS-Patienten in betroffenen Gehirnarealen die Glutamatkonzentration herabgesetzt ist, was aufgrund des Verteilungsmusters von Glutamat für eine intrazelluläre Verminderung spricht, manche Studien belegen auch eine extrazelluläre Glutamaterhöhung, z.B. im Liquor cerebrospinalis. Ursache hierfür könnte eine vermehrte Freisetzung von Glutamat sein mit nachfolgender Übererregung und Degeneration der Motoneuronen¹⁰. Rothstein et al.¹⁴ vermuteten als Ursache der extrazellulären Glutamaterhöhung eine verminderte Transportfähigkeit mit einer verminderten Aufnahme von Glutamat in die

Zelle. In organotypischen Rückenmarksschnitten hemmten sie selektiv das Glutamattransportprotein und konnten so eine Erhöhung des extrazellulären Glutamatspiegels bewirken, ein Effekt, der durch Gabe von Antagonisten, die entweder die non-NMDA-Rezeptoren hemmten oder die präsynaptische Glutamatfreisetzung blockieren, aufgehoben werden konnte. Antagonisten der NMDA-Rezeptoren zeigten dagegen keine neuroprotektive Wirkung. Auch bei Mäusen stellten sie durch Hemmung des Glutamattransports eine Schwächung der quergestreiften Muskulatur fest¹⁵. In einer weiteren Studie klonierten sie drei spezifische Glutamattransportproteine (EAAC-1 in Neuronen, GLT-1 und GLAST in Astroglia-Zellen) und fanden eine dramatische (71%) Verminderung von GLT-1-Protein, sowie eine moderate (20%) Verminderung von EAAC-1 in betroffenen Arealen von ALS-Patienten, wohingegen sie keine Veränderung bei GLAST-Protein im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden¹⁶. Auch bei einem weiteren Glutamattransportprotein, dem EAAT-2-Protein, das selektiv für Astroglia-Zellen ist, wurden verminderte Konzentrationen gefunden¹⁷.

Die Ursache für die Umverteilung des Glutamats bleibt jedoch weiterhin im Dunkeln und ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Zum einen könnte eine verminderte ATP-Bereitstellung bei gestörtem Energie-Haushalt der Zelle zu einer Erhöhung der Glutamat-Sensitivität führen, was wiederum zu einem Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle führen würde und damit zu einer Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteasen, Phospholipasen und NO-Synthasen¹⁰.

Zum anderen könnten Mutationen zu einer Veränderung der Glutamattransportproteine führen. So wurden in der kodierenden Region für EAAT-2-Protein zahlreiche Polymorphismen gefunden, die allerdings keine Häufung bei ALS-Patienten zeigten¹⁷. Bei ALS fanden sich Mutationen im Exon des DNA-Abschnittes, der für das Glutamattransportprotein der Gliazellen kodiert¹⁸. Auch unterschiedliche mRNA-Transskripte wurden für das EAAT-2-Protein bei sALS-Patienten gefunden¹⁹, wobei genetische Polymorphismen als Ursache für deren Entstehung noch nicht detektiert werden konnten²⁰.

Trotzdem bleiben Zweifel, ob die Ursache des Untergangs der Motoneurone in der Umverteilung von Glutamat liegt, denn hierfür müsste die extrazelluläre Glutamaterhöhung weit höher liegen als es bei neurodegenerativen Erkrankungen der Fall ist und die Glutamattmessungen *in vitro* können nicht automatisch mit den Glutamatkonzentrationen im synaptischen Spalt *in vivo* gleichgesetzt werden²¹.

So ermöglicht die Unterschiedlichkeit und Vielseitigkeit im Glutamathaushalt eine große Breite an Funktionsveränderungen wie den Selektivitätsverlust Glutamat-abhängiger Ionenkanäle oder die path. Sensitivität von Glutamatrezeptoren. Auch könnte die Glutamaterhöhung zur

Produktion von freien Sauerstoffradikalen führen und nachfolgend die Synthese von toxischem Nitritoxid (NO) bewirken und damit zum Untergang der Motoneurone beitragen¹⁵. Konsekutiv könnte eine Hemmung der Glutamat-abhängigen Signalübertragung nicht zuletzt dadurch neuroprotektiv sein, daß sie eine Stärkung der Widerstandskraft der Nervenzelle gegenüber anderen toxischen Mechanismen bewirkt²¹.

Trotz aller Zweifel hat sich gezeigt, daß die Gabe von Glutamat-Antagonisten einen geringgradig positiven Einfluß auf die Pathogenese von ALS besitzt und den Krankheitsverlauf verlangsamen kann²². Eine alleinige pathogenetische Bedeutung ist dem Glutamat nach den heute vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht zuzuweisen¹⁰.

Zusätzlich zu den obengenannten Befunden von Glutamat konnten auch Verminderungen von anderen exzitatorisch wirksamen Aminosäuren wie Aspartat und N-Acetylaspartat sowie N-Acetylaspartylglutamat gefunden werden²³.

Pathogenetisch bedeutsam hinsichtlich des Einflusses der exzitatorischen Aminosäuren ist auch die Entdeckung, daß bei ALS-Patienten in betroffenen Arealen die Aktivität der Proteinkinase C, eines Ca^{2+} - und Phospholipid-abhängigen Enzyms, erhöht ist und dies einen Einfluß auf Strukturproteine und Rezeptoren von Neurotransmittern besitzen kann²⁴.

1.6.4.3 Oxidativer Streß

Unter oxidativem Streß versteht man die Schädigung einer Zelle durch eine Störung der mitochondrialen Atmungskette und damit der Sauerstoff- und Energiegewinnung einer Zelle oder eine Störung bei der Entgiftung toxischer Sauerstoffverbindungen.

Die Bezeichnung oxidativer Streß beschreibt also einen Zustand, in dem die Zelle nur über unzureichende Mechanismen verfügt, um die Konzentration toxischer Sauerstoffprodukte auf einem -für das Überleben der Zelle nötigen- niedrigen Level zu halten²⁵.

Durch die Komplexizität dieser Reaktionen können solche Störungen an sehr unterschiedlichen Stellen auftreten. Ein Ansatzpunkt ist die oben beschriebene Sensitivitätserhöhung für Glutamat, die über Rezeptoren eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels vermittelt. Dadurch kann es zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Enzymen wie Proteasen, Phospholipasen und NO-Synthetasen kommen, was zu einer gesteigerten Stickstoffoxid- (NO)- und Superoxidradikal- (O_2)-Produktion führt¹⁰. Auch Mitochondrien, der Arachnidonsäurestoffwechsel, die Xanthin-

Oxidase, Monoamino-Oxidase und P450-Enzyme tragen zu einer erhöhten Konzentration toxischer Sauerstoffprodukte bei²⁵.

Genauso kann nicht nur die gesteigerte Produktion solcher Produkte zu einer Zellschädigung führen, sondern auch die verminderte Fähigkeit zum Abbau durch einen Funktionsverlust von Enzymen wie der Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase, Glutathion-Peroxidase (GPX) oder anderer Substanzen wie Glutathion, Ascorbinsäure und Vitamin E²⁶.

Auch eine – z.B. durch die später beschriebenen Mutationen der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase - bedingte Störung der Kupfer- oder Zinkbindung mit nachfolgender intrazellulärer Anhäufung von Kupfer oder Zink könnte einen toxischen Einfluß auf die Mitochondrien haben und damit zu oxidativem Streß führen¹⁰. Die wichtige Rolle von Kupfer bei der Ausbildung neurodegenerativer Symptome zeigen Erkrankungen wie M. Wilson oder M. Menke, genauso wie neuere Studien den Einfluß von Kupfer bei der Pathogenese von M. Alzheimer und der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung belegen²⁷.

Ein Beleg für die Schädigung von Proteinen, DNA und Membranphospholipiden durch Sauerstoffradikale ist die Tatsache, daß die Konzentrationen von Malondialdehyd – ein Endprodukt der Oxidation der Membranlipide - sowohl bei fALS als auch bei sALS-Patienten erhöht ist²⁸. Ebenfalls eine Konzentrationserhöhung zeigte 8-Hydroxyl-2-Deoxyguanosin (8-OHdG), ein Marker für die Oxidation von DNA bei sALS²⁹, wenngleich nicht bei fALS²⁸.

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von oxidativem Streß ist die Erhöhung von 4-Hydroxynonenal, einem Marker für Lipidoxidation in Zellen, der im Liquor³⁰ und im Rückenmark³¹ nachgewiesen werden konnte.

Einen Überblick über das Gleichgewicht einer Zelle zwischen oxidativem Zellschaden oder gesundem Stoffwechselgleichgewicht und den beeinflussenden Faktoren gibt die nachstehende Tabelle.

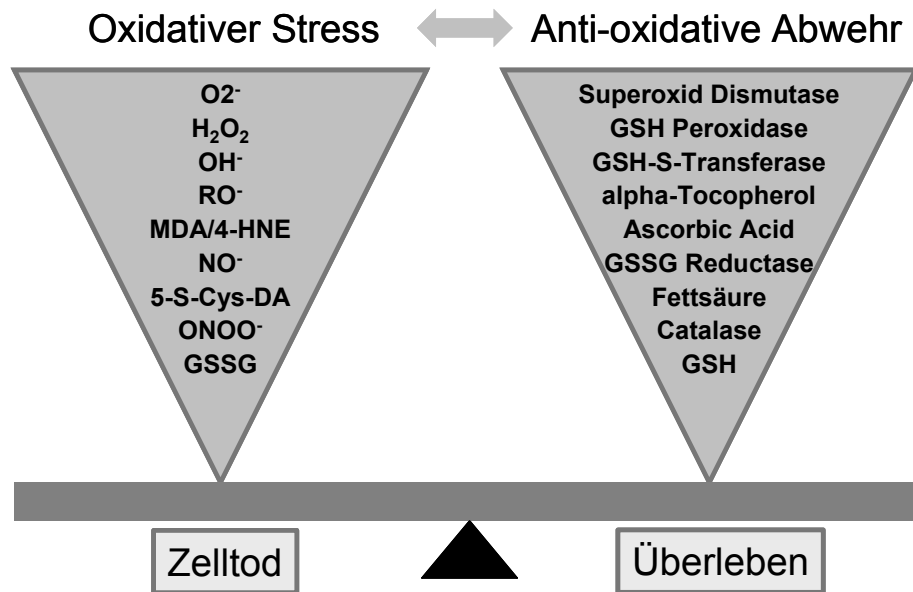


Abb. 1: Substanzen mit Einfluß auf oxidativen Streß und deren Gegenspieler; nach: F. Facchinetti, V.L. Dawson, T.M. Dawson: Free radicals as mediators of neuronal injury; Cell Mol Neurobiol 18(6); 667-682; 1998

Toxische Sauerstoffprodukte können zu einer Veränderung der Transkription und/oder Translation führen²⁵, so daß schließlich letale Proteine entstehen, die eine Aktivierung von Endonukleasen bewirken und schließlich die Kondensation und anschließende Fragmentation des Kernchromatins hervorrufen. Diese Entwicklung bezeichnet man als Apoptose, einem aktiv regulierten, energieverbrauchenden Prozeß der Zellzerstörung³². Genauso können toxische Sauerstoffprodukte allerdings die andere Form des Zelltodes, die Nekrose, bewirken, bei der es durch die Störung der mitochondrialen Atmungskettenphosphorylierung zu einem ATP-Verlust mit konsekutiver Störung ATP-abhängiger Zellfunktionen kommt³².

Die Frage, ob es sich bei dem Zelluntergang der ALS um Apoptose oder Nekrose handelt, ist bis jetzt widersprüchlich diskutiert worden.

Martin et al.^{8,33} fanden in betroffenen Arealen bei ALS-Patienten typische Merkmale der Apoptose, wie DNA-Fragmentation, erhöhte Caspase-3-Aktivität und eine erhöhte Aktivität der proapoptotischen Enzyme Bax und Bak in den Mitochondrien, wohingegen das antiapoptotische Enzym Bcl-2 in den Mitochondrien vermindert war. Diese Ergebnisse werden von anderen Studien gestützt, die in vitro und in vivo bei neurodegenerativen Erkrankungen, speziell bei M. Alzheimer, eine Erhöhung der proapoptotischen Gene feststellten¹².

Im Gegensatz hierzu fanden He und Strong³⁴ bei degenerierenden Motoneuronen keine morphologischen Anzeichen für Apoptose und keine positive TUNEL-Reaktion.

Unabhängig von der Art der Zellschädigung durch toxische Sauerstoffprodukte konnte deren Einfluß bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson, M. Alzheimer und Friedreich-Ataxie bereits beschrieben werden²⁵. Dies wird auch durch die Tatsache belegt, daß Melatonin als gut liquorgängiger Radikalfänger eine neuroprotektive Wirkung bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen besitzt³⁵.

Histologische Untersuchungen zeigten, daß H_2O_2 und Fe^{2+} alleine noch keine signifikante Zerstörung von Neuronen bewirken konnten, wohingegen OH alleine schon einen Neuronenuntergang hervorrufen konnte³⁶.

1.6.4.4 Cu/Zn-Superoxid-Dismutase

Neben den obengenannten Ursachen von oxidativem Streß hat vor allem die Entdeckung von Mutationen im Gen der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD-1) bei fALS-Patienten große Aufmerksamkeit erzeugt, nachdem zunächst das Chromosom 21 als ursächliches Gen für fALS ausgemacht werden konnte³⁷. Mittlerweile sind bei fALS über 90 verschiedene Mutationen des SOD-1-Gens gefunden worden³⁸, wobei deren Einfluß auf die Enzymaktivität unterschiedlich beurteilt wird. Auch bei sALS wurden vier Punktmutationen festgestellt, von denen zwei mit den Mutationen bei fALS identisch sind³⁹.

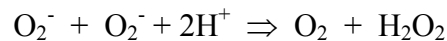
Einerseits wurde in verschiedenen Studien eine Funktionsminderung (*loss of function*) der SOD-1 bei fALS-Patienten festgestellt^{40,41,42} obwohl bei autosomal-dominanten Erkrankungen eher mit einer Aktivitätssteigerung (*gain of function*) des mutierten Enzyms gerechnet wurde. Bei transgenen Mäusen, die sowohl das normale Mausgen für SOD-1 als auch ein mutiertes Gen trugen, trat eine selektive Degeneration von Vorderhornzellen auf, was als Hinweis auf einen pathologischen Funktionsgewinn gewertet wurde (*gain of function*)²⁸. Nach Moumen et al. ließen sich Aktivitätserhöhungen der SOD-1 nicht nur bei fALS, sondern auch bei sALS finden⁴³, wohingegen Przedborski et al.⁴⁴ eine Aktivitätsminderung der SOD-1 bei fALS-Patienten mit Mutationen fanden, die SOD-1-Aktivität bei fALS ohne SOD-1-Mutation oder bei sALS jedoch unverändert im Vergleich zu Kontrollen war. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Fujita et al., die ebenfalls keine Aktivitätsveränderung von SOD-1 und GPX bei sALS fanden, allerdings eine verminderte Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase⁴⁵.

In einer neuen Studie von Bonnefont-Rousselot⁴⁶ fand sich dagegen eine erhöhte SOD-1-Aktivität.

Auch bei anderen Formen der SOD wurden mittlerweile Mutationen gefunden. So fand sich ein Polymorphismus der Mangan-SOD (MnSOD), der mit einem signifikant höheren Risiko für

sALS behaftet ist⁴⁷. Bei 30% der sALS-Patienten fanden sich erhöhte Konzentrationen der Mn-SOD, verbunden mit einer verminderten Superoxid-Produktion und verminderter Expression von Bcl-2⁴⁸.

SOD-1 katalysiert folgende Reaktion:



In vitro wurde auch die Fähigkeit von SOD-1 festgestellt, die Dissoziation von H_2O_2 zu OH zu katalysieren und daß diese Fähigkeit bei der mutierten Variante von SOD-1 erhöht ist³⁸.

Dazu paßt die Feststellung, daß die extrazellulären Konzentrationen für H_2O_2 und OH bei transgenen Tieren mit der Mutation G93A (Glycin→Alanin) des SOD-1-Gens signifikant erhöht sind, wohingegen die Konzentration von O_2 signifikant erniedrigt war³⁸.

Die erhöhte Konzentration von toxischem OH könnte allerdings auch durch eine verminderte SOD-1-Funktion bedingt sein, indem O_2 mit Stickstoffoxid (NO) zu Peroxynitrit (ONOO^-) reagiert, das durch Protonierung zu ONOOH wird und zu OH und NO_2 zerfällt¹⁰.

Stickstoffoxid ist ein Auslöser für Apoptose, wobei die Funktionstüchtigkeit der Cu-Zn-SOD ausschlaggebend ist für die Widerstandsfähigkeit einer Zelle gegenüber dieser NO-abhängigen Apoptose⁷.

1.6.4.5 Peroxynitrit

Auch Peroxynitrit (ONOO^-), das aus O_2 und NO gebildet wird, ist ein stark toxisch wirkendes Radikal, das Organellen, Membrane und Enzyme schädigen kann. Nur wenige biologische Substanzen können direkt zur Entgiftung von Peroxynitrit beitragen, dazu gehören: Hämoglobin, Peroxidasen und Selenoproteine wie Glutathion-Peroxidasen⁴⁹. Peroxynitrit entsteht durch eine vermehrte Aktivität der glutaminergen Neurotransmission und durch mitochondriale Dysfunktion, zwei Mechanismen, die Frühzeichen eines neuronalen Schadens sein können⁵⁰. Ein Teil seiner schädigenden Wirkung entsteht durch die Nitrierung der Tyrosinreste von Proteinen. So kann die Bestimmung von Nitrotyrosin ein Marker für das Ausmaß des durch Peroxynitrit verursachten Zellschadens sein⁵⁰. Der schädigende Einfluß von Peroxynitrit und Stickstoffoxid auf Motoneurone in Zellkulturen ist von Estevez beschrieben worden⁵¹. Dies spielt z.B. eine Rolle bei dem neuronalen Zellschaden bei autoimmuner Enzephalitis⁵² und bei M. Alzheimer⁴⁹. Auch bei fALS mit SOD-1-Mutation zeigten sich erhöhte Konzentrationen von Nitrotyrosin⁵³.

Die Toxizität der mutierten SOD-1-Variante kann durch eine vermehrte Bildung von Nitrotyrosin, das durch eine verminderte Affinität der SOD-1 zu Zink entsteht, bedingt sein⁵⁴. Abe et al. vermuteten anhand ihrer Ergebnisse eine erhöhte Bildung von Nitrotyrosin bei sALS^{55,56}. Diese Ergebnisse konnten durch Beal et al.⁵³ und durch Toghi et al.⁵⁷ sowohl bei fALS als auch bei sALS bestätigt werden.

1.6.4.6 Glutathion

Glutathion ist ein Tripeptid aus Cystein, Glutaminsäure und Glycin und fungiert als wichtiger intrazellulärer Radikalfänger, der mit Hilfe der γ -Glutamylcystein-Synthetase und Glutathion-Synthetase synthetisiert wird. Daneben ist es für die Aufrechterhaltung der Erythrozytenstruktur und des zweiwertigen Zustandes des Eisens im Hämoglobin verantwortlich. Extrazelluläres Glutathion dient als Substrat für die γ -Glutamyl-Transpeptidase, ein Enzym der Zellmembran, das Cysteinylglycin von Glutathion abspaltet. Cysteinylglycin wird in Cystein und Glycin hydrolysiert und kann in dieser Form von der Zelle aufgenommen werden, um dort erneut zur Bildung von Glutathion zur Verfügung zu stehen.

Der Glutathion-Stoffwechsel spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung freier Radikale, der Synthese von Neurotransmittern wie Glutamat und GABA und ist mit der Energiegewinnung der Zellen verknüpft⁵⁸. So kann eine Verminderung von Glutathion einerseits durch die Radikalenbildung und mitochondriale Dysfunktion direkt zu erhöhtem oxidativem Streß führen, andererseits eine vermehrte Synthese exzitatorischer, toxischer Neurotransmitter und eine Aktivierung von Peroxidasen bewirken und so den Zelltod von Motoneuronen herbeiführen⁵⁹.

Eine Abnahme der Glutathion-Konzentration wurde in der häufigsten „neurodegenerativen Erkrankung“, dem Altern, nachgewiesen⁶⁰. Auch bei M. Parkinson fand sich in mehreren Studien eine Verminderung von Glutathion⁶¹.

Lanius et al.⁶² fanden vermehrte Bindungsstellen für Glutathion im Vorder- und Hinterhorn bei Patienten mit sALS im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, was als Gegenregulation des Körpers im Sinne einer *upregulation* bedingt durch Glutathionmangel gedeutet werden könnte.

So könnte bei ALS eine Störung des Glutathionstoffwechsels nicht nur die vermehrte Konzentration von Sauerstoffradikalen, sondern – bei vermehrter Aufspaltung von Glutamat durch die γ -Glutamyl-Transpeptidase – auch die erhöhte Konzentration von Glutamat erklären²⁵.

Die Beteiligung von Glutathion an der Pathogenese der ALS führte zu einem Therapieversuch, bei dem Glutathion mittels täglichen i.m. Injektionen substituiert wurde. Hier wurde allerdings

eine allenfalls geringe Verlangsamung der Krankheitsprogression für die Dauer der Substitution festgestellt⁶³.

1.6.4.7 Glutathion-Peroxidase

Ein weiteres Enzym, das bei der Entgiftung toxischer Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle spielt und wesentliche Grundlage dieser Arbeit ist, ist die Glutathion-Peroxidase (GPX). Sie katalysiert folgende Reaktion:



Glutathiondisulfid wird mittels der Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH, das dem Pentosephosphatweg entstammt, wieder in die Sulfhydrylform von Glutathion reduziert. Dabei werden die Elektronen des NADPH zunächst auf FAD und erst dann auf die Disulfidbindung des oxidierten Glutathion übertragen.

Nachstehende Graphik zeigt eine Übersicht des Glutathion-Stoffwechsels:

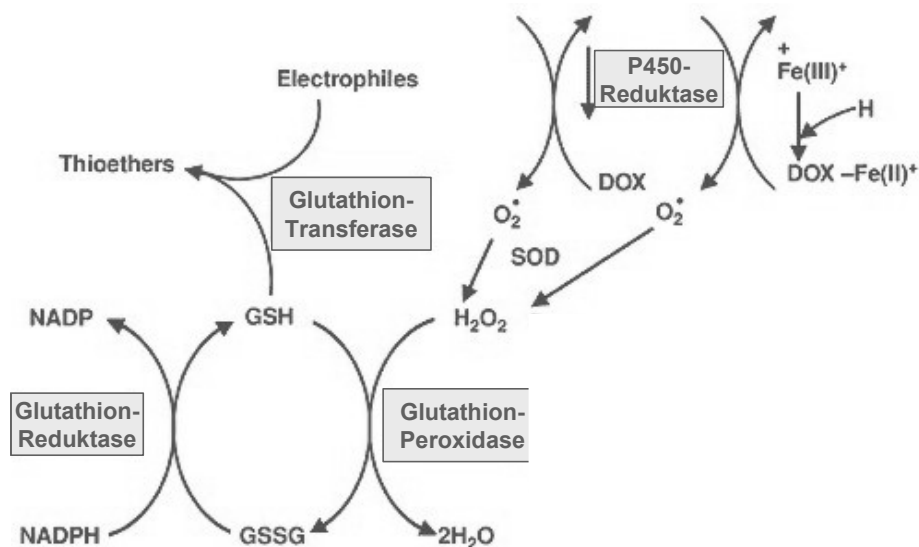
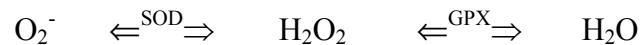


Abb.2: Glutathion-Stoffwechsel

Zwischen SOD und GPX besteht folgende Interaktion:



Bis heute konnten folgende verschiedene Isoenzyme der GPX ausgemacht werden:

- Zelluläre Glutathion-Peroxidase (GPX-1): ubiquitäres Vorkommen
- Gastrointestinale Glutathion-Peroxidase (GPX-2): im Magen-Darm-Trakt sowie in Leber, Gallenblase und Prostata
- Plasmatische Glutathion-Peroxidase (GPX-3)
- Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase (GPX-4)
- GPX-5: vor allem in Nebenhoden exprimiert; als Einzige der Glutathion-Peroxidasen nicht abhängig von Selen

Nachdem die GPX im Jahre 1957 durch Mills et al. entdeckt wurde, fand man schnell heraus, daß sie zu der Gruppe der Selenoenzyme gehört, also Selen im aktiven Zentrum beinhaltet. Durch den nukleophilen Charakter der Selenol-Gruppe war die Funktion der GPX als Radikalfänger offensichtlich.

Im Jahre 1989 wurde als Genlokus für die zelluläre GPX-1 die Region 3p21.3 von Chromosom 3 ausgemacht⁶⁴. Das Gen hat eine Länge von 4407 bp und beinhaltet zwei Exons (GPXa-DNA 856 bp, GPXb-DNA 819 bp).

Durch die entscheidende Rolle der GPX bei der Beseitigung freier Radikale lag es auf der Hand, Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen auf Funktionsstörungen der GPX zu untersuchen, wobei bis heute unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse gefunden wurden.

Moumen et al. bestimmten im Jahre 1997 die Plasma-Aktivitäten von SOD und GPX bei sALS-Patienten und fanden eine erhöhte Aktivität der SOD sowie eine verminderte Aktivität der GPX⁴³. Diese Ergebnisse konnten durch Apostolski et al. im Jahre 1998 teilweise bestätigt werden⁶⁵. Sie entdeckten bei sALS eine verminderte Aktivität der GPX und SOD-1 in Erythrozyten und eine unveränderte Aktivität der Glutathion-Reduktase und Glutathion-Transferase. So konnte festgestellt werden, daß molekularbiologische Veränderungen bei sALS nicht nur in betroffenen Regionen reproduzierbar sind, sondern sich auch in anderen Zellen, wie z.B. Erythrozyten, nachweisen lassen. Ein Behandlungsversuch mit Selen, Aminosäuren und Ca-

Kanal-Blockern zeigte eine Aktivitätssteigerung der GPX und eine Konzentrationserhöhung von Vitamin E, verbunden mit einer Verlangsamung der Progression der sALS.

Dagegen fanden Fujita et al.⁴⁵ keine Unterschiede der GPX-Aktivität und auch der SOD-Aktivität im Rückenmark von sALS-Patienten im Vergleich zu anderen Zellproben der Patienten. Sie entdeckten eine verminderte Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase bei sALS und schlossen anhand ihrer Ergebnisse, daß Sauerstoffradikale die mitochondriale Atmungskette angreifen könnten, was zu einer Degeneration von Motoneuronen führen würde.

Auch Przedborski et al.⁴⁴ fanden in den Erythrozyten bei sALS-Patienten eine unveränderte Aktivität im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, lediglich bei sALS-Patienten, die mit dem Insulin-Wachstumsfaktor I behandelt wurden, war die GPX-Aktivität signifikant vermindert. Die Aktivität der Katalase war sowohl bei sALS als auch bei fALS normal. Ähnliche Ergebnisse mit einer unveränderten Aktivität der GPX bei fALS erhielten Andersen et al.⁴².

Im Jahre 1996 wurden die Aktivitäten der GPX, SOD und Katalase im Gyrus praecentralis in Gehirnen von Patienten, die an sALS verstorben waren, bestimmt und mit den Aktivitäten in der Kleinhirnrinde derselben Patienten verglichen. Die Aktivitäten wurden spektrophotometrisch bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Aktivitätsminderung der GPX im Gyrus praecentralis, also einer von ALS betroffenen Region, im Vergleich zur Kleinhirnrinde, einer von ALS nicht betroffenen Region. Dagegen fanden sich keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Aktivität der SOD-1, der Mn-SOD und der Katalase. Der Proteingehalt der plasmatischen GPX (GPX-3) war ebenfalls unverändert. Przedborski et al. konnten in dieser Studie auch einen Zusammenhang zwischen der Krankheitsdauer und der GPX-Aktivität feststellen: die Aktivität war in den Gyrus praecentrales von den Patienten am geringsten, die die kürzeste Krankheitszeit hatten und umgekehrt⁶⁶. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie fanden Ince et al. eine Aktivitätserhöhung der GPX⁶⁷.

1.6.4.8 Sonstige genetische Ursachen

Bei M. Alzheimer wurde eine Assoziation mit dem $\epsilon 4$ -Allel von Apolipoprotein E herausgefunden, daß das Risiko, an M. Alzheimer zu erkranken, signifikant erhöht, auch wenn nicht alle Menschen, die das $\epsilon 4$ -Allel tragen, an M. Alzheimer erkranken^{68,69}. Auch bei sALS-Patienten hat sich herausgestellt, daß Patienten, deren Erkrankung mit bulbären Symptomen beginnt, häufiger das $\epsilon 4$ -Allel für Apolipoprotein E tragen⁷⁰. Hiermit könnte das kognitive Defizit assoziiert sein, das insbesondere bei der bulbär oder pseudobulbär beginnenden Form der ALS vorkommt.

In einer neueren Studie wurden bei sALS-Patienten vier verschiedene Polymorphismen der Apurin/Apyrimidin-Endonuklease gefunden, die einen großen Anteil an der DNA-Reparatur hat, von denen das Allel D148E im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht war. Der dadurch bedingte Aminosäuren-Austausch könnte einen Anteil an der Pathogenese der ALS besitzen⁷¹.

10nm-Neurofilamente sind wichtige Bestandteile der Myelinscheiden von Axonen. Sie bestehen aus drei verschiedenen Polypeptid-Untereinheiten mit unterschiedlichen Molekulargewichten (NF-L, NF-M, NF-H). Die Akkumulation von 10nm-Neurofilamenten in den Axonen von Motoneuronen ist ein charakteristisches neuropathologisches Merkmal von sALS und fALS¹. Eine vermehrte Expression der NF-L-Untereinheit führt bei transgenen Mäusen zu einer Schwellung des Perikaryons mit konsekutiver Degeneration der Motoneurone⁷². Auch eine vermehrte Expression der NF-H-Untereinheit führt zu einem dramatischen Defekt der axonalen Übertragung⁷³. Bis heute wurden mehrere Mutationen des Gens für die Neurofilamente gefunden, wobei noch kein spezifischer Zusammenhang mit sALS oder fALS hergestellt werden konnte⁷⁴.

1.6.4.9 Trinukleotid-Expansion

Als Trinukleotide bezeichnet man eine Gruppe von drei Nukleotiden, die zusammen ein Kodon ergeben, also für eine Aminosäure kodieren. Sie fördern die Bindung spezifischer tRNA-Moleküle an Ribosomen, ohne daß eine Proteinsynthese stattfindet. Dagegen besitzen beispielsweise Dinukleotide keine solche Wirkung. Ein Trinukleotid bindet genau an das spezielle tRNA-Molekül, für das es das Kodewort darstellt.

Das normale Genom enthält Sequenzen unmittelbar aufeinanderfolgender identischer Dreierfolgen von Basenpaaren, sog. *triplet repeats* oder Trinukleotid-Repeats. Die Länge solcher Repeats schwankt zwischen den Individuen und der Generationenfolge innerhalb eines relativ konstanten Bereiches. Die Anzahl solcher Repeats wird bei gesunden Individuen unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes gehalten. Durch Mutationen kann die Anzahl der Repeats oberhalb des Schwellenwertes gelangen, wodurch die Wahrscheinlichkeit an einer zunehmenden Expansion der Repeats mit der Anzahl an Zellteilungen zunimmt und das System instabil wird. Man spricht dann von dynamischen Mutationen⁷⁵. Dadurch kann es zur Ausbildung von DNA-Blasen (sog. *loops*) oder DNA-Haarnadeln (sog. *hairpins*) kommen.

So entstehen Verschiebungen eines DNA-Stranges, die bei der Replikation entweder zu einer Verlängerung oder zu einer Verkürzung des Tochterstranges führen⁷⁵. Die Wahrscheinlichkeit solcher Verschiebungen nimmt proportional zu der Anzahl der Repeats zu.

Bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen fand sich eine Expansion mit einer übermäßigen Anzahl von Triplets außerhalb des Bereichs von gesunden Individuen. So fand sich z.B. bei der spinobulbären Muskelatrophie eine Expansion des Basentriplets CAG im Androgenrezeptor auf 40-62 Triplets im Vergleich zu 11-33 Triplets bei Gesunden. Auch bei der myotonen Dystrophie Curschmann-Steinert expandierte das Triplet CGG von normal 6-54 auf 200-4000 Repeats⁷⁷. Ähnliche Ergebnisse fand man auch bei M. Huntington-Chorea, der dentatorubropallido-Luysischen Atrophie, der spinocerebellären Ataxie Typ I und III, dem fragilen X-Syndrom und der Friedreich-Ataxie⁷⁸. Bei allen Krankheiten fanden sich bei erkrankten Personen mehr Repeats als bei gesunden Personen. Die Anzahl der vermehrten Repeats schwankte hierbei zwischen drei und knapp 4000. Untersuchungen über eine Beziehung zwischen der Länge des expandierten Repeats und der Symptomatik der Erkrankung brachten bisher unterschiedliche Ergebnisse. So fanden sich zunächst für einige der Erkrankungen erhöhte Prävalenzen, wenn in der Bevölkerung häufiger vermehrte Expansionen auftraten⁷⁹, andere Untersuchungen zeigten Korrelationen zwischen der Anzahl der Repeats und dem Alter der Erstmanifestation der Erkrankung⁸⁰. Für die myotone Dystrophie und Huntington-Chorea ließ sich der Zusammenhang feststellen, daß der zunehmende Schweregrad des genetischen Defektes mit der klinischen Symptomatik in aufeinanderfolgenden Generationen korreliert (Antizipation)⁸¹. Dagegen ließ sich beispielsweise bei der spinobulbären Muskelatrophie ein solcher Zusammenhang in Studien nicht feststellen⁷⁸.

1.7 Herleitung der Fragestellung

Die Grundlagen für die Herleitung der Fragestellung sind folgende:

1. Die Beteiligung freier Radikale und speziell des Glutathion-Systems an der Pathogenese der ALS erscheint nach kritischer Betrachtung der vorliegenden – oben angeführten – Studienergebnisse als wahrscheinlich. Die Frage, was letztendlich die Ursache der pathogenetischen Veränderungen darstellt, läßt sich jedoch bis heute nicht beantworten. Die bisher vorliegenden Ergebnisse scheinen die Theorie einer multifaktoriellen Ätiopathogenese zu stützen.

2. Eine wichtige Rolle bei der Pathogenese zumindest einiger neurodegenerativer Erkrankungen scheint die oben beschriebene Expansion bestimmter Trinukleotid-Repeats zu spielen.

Ein Bindeglied zwischen diesen beiden Säulen stellen die Ergebnisse einer Studie von Shen et al. aus dem Jahre 1994 dar⁸². Sie fanden bei 55 zufällig ausgewählten Personen eine GCG-Trinukleotid-Expansion im 1. Exon des Gens der zellulären Glutathion-Peroxidase, deren Verteilung sie anhand der Allel-Häufigkeiten nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz folgendermaßen ermittelten:

Allele	Häufigkeit	Allele	Häufigkeit
4/4	0,16	4/5	0,28
5/5	0,13	4/6	0,20
6/6	0,06	5/6	0,17

Abb. 3: Allel-Häufigkeiten der GPX-1 ermittelt nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz durch Shen et al. in Genomics 1994; 23, 292-294

Nach den Ergebnissen dieser Studie scheint diese Expansion keinen Einfluß auf die Enzymaktivität der Glutathion-Peroxidase zu haben. Die Detektion der Repeats erfolgte durch PCR mit anschließender Autoradiographie, bei der Radioisotope, in diesem Fall 1µCi [α -³²P]dCTP, in die Sequenzierungsprimer eingebaut werden. Diese Methode ist neben einem hohen finanziellen Aufwand nicht nur sehr zeitintensiv, da vier Sequenzierungsreaktionen nötig sind (je eine für jeden der dNTP-Terminatoren), sondern auch mit einem hohen materiellen Aufwand verbunden. Aufgrund der energiereichen β -Strahlung darf das gesundheitliche Risiko nicht unberücksichtigt bleiben.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dieser Trinukleotid-Expansion bei sALS-Patienten und vergleicht deren Verteilung mit einer Kontrollgruppe ohne sALS.

Im Einzelnen ergaben sich für diese Arbeit folgende Problemstellungen bzw. Fragen:

1. Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Verteilung oben beschriebener Trinukleotid-Expansionen der GPX-1 in einer Population von sALS-Patienten und einer nicht an sALS erkrankten Kontrollgruppe.

2. Stimmen die unter 1. gewonnenen Daten mit den Literaturdaten überein oder ergeben sich Unterschiede?
3. Gibt es anhand einer möglichen Assoziation von Polymorphismen im GPX-1 Gen Hinweise auf eine Assoziation dieses Gens mit der sALS?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Proben

Bei den Patientenproben handelt es sich um EDTA-Blut, das aus Berlin, Homburg/Saar, Ulm und Hannover stammt.

Für die Kontrollgruppe wurde DNA von Berliner Medizinstudenten verwendet.

2.1.2 DNA-Extraktion

Geräte

Absauggerät miniport (KNF Neuberger)

Heizplatte criblock DB3D (Techne)

Vortexgerät (Janke und Kunkel)

Zentrifuge Biofuge A (Heraeus-Christ, Hamburg)

Materialien

1,5 ml safe lock Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

Pipetten Finnpiette (Labsystems)

Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg)

Chemikalien

Proteinase K (Merck, Darmstadt)

TE-Puffer (Tris, EDTA)

DB-Puffer (KCl, Tris, MgCl₂, Tween 20)

2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Geräte

DNA Thermal Cyclor 480 (Perkin-Elmer, Überlingen)

Robocycler (Stratagene)

TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen)

Materialien

0,2 ml MicroAmp reaction tubes und caps (8 caps/strip)

Chemikalien

Amplitaq- Gold (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Bayol F (Merck, Darmstadt)

dNTPs (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

PCR-Puffer (New England Biolabs)

Primer F1, R1, R1a, R1b, R1c (Tib Molbiol, Berlin)

Taq-Polymerase (Pharmacia, Freiburg)

2.1.4 Polyacrylamidgele

Geräte

Magnetrührer RCT basic (Janke und Kunkel)

Waage PG5002 (Mettler, Toledo)

Materialien

50 ml combitip Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

GelBondfolien (FMC, Rockland, USA)

Glasplatten, 100 x 260 x 5 mm (Pharmacia, Freiburg)

Glasplatten, 200 x 260 x 5 mm (Pharmacia, Freiburg)

Glasplattenklemmen (Pharmacia, Freiburg)

Kimwipes (Kimberly & Clark)

Meßzylinder

Roller

Chemikalien

Acrylamid (Bio Rad, Hercules, USA)

Ammoniumpersulfat (Bio Rad, Hercules, USA)

Bis-N-N-Methylen-Bis-Acrylamid (Bio Rad, Hercules, USA)

Borsäure (Merck, Darmstadt)

Dimethyl-Dichloro-Silane (Repel-Silane) (Merck, Darmstadt)

Dinatrium-Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA, Titriplex) (Merck, Darmstadt)

Harnstoff (Merck, Darmstadt)

N-N-N-N-Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin (Bio Rad, Hercules, USA)

Tris-Hydroxy-Methyl-Amino-Methan (Merck, Darmstadt)

2.1.5 Gelelektrophorese

Geräte

Elektrophoresekammer (Multiphor II, Pharmacia Freiburg)

Kühlung K 20 (Haake)

Power-Pac 3000 (Bio-Rad, München)

Materialien

10 bp DNA-Leiter (GIBCO, Eggenstein)

100 bp DNA-Leiter (GIBCO, Eggenstein)

1000 bp DNA-Leiter (GIBCO, Eggenstein)

Filterpapier (Whatman)

Chemikalien

1x TBE-Puffer (Borsäure, Tris, EDTA, H₂O)

Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)

2.1.6 Silberfärbung

Geräte

Celloshaker (Renner, Darmstadt)

Scanner Gel Doc 1000 (Bio-Rad, München)

Materialien

Entwicklungsschale

Färbeschale

Meßzylinder

Plastikfolie

Chemikalien

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Formaldehyd 37 % (Merck, Darmstadt)

Hac (Eisessig) (Merck, Darmstadt)

Natriumborhydrid (Merck, Darmstadt)

Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt)

Silbernitrat (Merck, Darmstadt)

2.1.7 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

Geräte

s. PCR

Materialien

s. PCR

Chemikalien

Cfo I (New England Biolabs, Schwalbach)

Hae II (New England Biolabs, Schwalbach)

Hae III (New England Biolabs, Schwalbach)

Restriktionspuffer L (Boehringer, Mannheim)

Restriktionspuffer M (Boehringer, Mannheim)

Restriktionspuffer NEB 2 (New England Biolabs)

2.1.8 Sequenzierung

Geräte

ABI DNA-Sequenzer 373 A (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Speed Vacuum Schleuder Centrivac (Heraeus-Christ, Hanau)

Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburg)

Materialien

Eis

Glasplatten (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Glasplattenklemmen

Haifischkamm (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Meßzylinder

Tetra Analyze Software (SoftGene, Berlin)

Vorkamm (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Chemikalien

Alconox

Di-Natrium-Ethylen-Diamino-Tetraacetat (Merck, Darmstadt)

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Formamid (Sigma, St. Louis, USA)

QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

TBE-Puffer (Gibco, Eggenstein)

Siehe 2.1.3

2.2 Methoden

2.2.1 Proben

Die anonymisierten 231 Blutproben der ALS-Patienten stammen aus der ALS-Sprechstunde der Charité und wurden uns von den Universitätskliniken Hannover, Homburg/Saar und Ulm zugesandt.

Die 138 Proben der Kontrollgruppe entstammen einer Zufallsauswahl Berliner Medizinstudenten.

Die Blutproben wurden mittels Venenpunktion unter sterilen Gesichtspunkten gewonnen und in EDTA K Monovetten mit dem Volumen 2,7 ml der Firma Sarstedt eingefüllt. Hiernach wurden die Blutproben bis zu ihrer Weiterverarbeitung tiefgefroren. Ein Teil der verwendeten Patientenproben sowie alle Proben der Kontrollgruppe lagen nicht als Vollblut sondern bereits als fertig extrahierte DNA vor.

Das Votum der Ethik-Kommission der Humboldt-Universität Berlin liegt vor.

2.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde nach dem Protokoll des Institutes für Pathobiochemie und Laboratoriumsmedizin der Humboldt-Universität in Form einer DNA-Schnellextraktion durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst die Blutproben schonend aufgetaut und aus jeder 2,7 ml Monovette 1 ml in ein 1,5 ml safe lock Gefäß der Firma Eppendorf überführt. Der verbliebene Rest der Blutproben wurde für etwaige zukünftige Untersuchungen umgehend wieder eingefroren.

Von dem so gewonnenen 1 ml Vollblut wurden 200 µl Blut zusammen mit 1000 µl TE-Puffer in ein neues 1,5 ml safe lock Gefäß überführt und bis zur vollständigen Durchmischung kurz auf das Vortexgerät verbracht. Hiernach wurden die Proben in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur für 20 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert, wodurch eine Trennung in eine organische und eine wässrige Phase erreicht wurde. Die wässrige Phase wurde nun abgegossen bzw. mit dem Absauggerät vorsichtig abgesaugt, so daß lediglich das Sediment verblieb. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen, wurde nun zu dem Sediment abermals 1000 µl TE-Puffer hinzugegeben, gevortext, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Um nun die stabilere Membran der kernhaltigen Leukozyten zu lysieren und die verbliebenen Proteine zu verdauen, wurde zu jeder Probe 300 µl Proteinase-K-Pufferlösung gegeben. Zur

Herstellung dieser Proteinase-K-Pufferlösung wurden 10 mg Proteinase K in 1000 µl H₂O gelöst. Um die Proteinase-K-Pufferlösung zu erhalten, wurden 10 µl dieser Lösung mit 1000 µl DB-Puffer gemischt.

Die mit 300 µl dieser Pufferlösung versehene Probe wurde erneut kurz gevortext und schließlich beim Temperaturoptimum der Proteinase K von 56°C in der Heizplatte inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine Heizplatte mit der Arbeitstemperatur von 100°C überführt, um die Proteinase K zu inaktivieren, da diese sonst zu einer verminderten Wirksamkeit der in der PCR verwendeten Taq-Polymerase führen würde.

Die so erhaltenen Proben mit der extrahierten DNA wurden nun entweder bis zu ihrer baldigen Weiterverarbeitung bei -4°C gekühlt gelagert oder bei -18°C tiefgefroren.

Pufferlösungen für den Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP):

TE-Puffer (pH 8):	20mM	Tris
	1mM	EDTA
DB-Puffer:	50 mM	Tris
	20mM	KCl
	2,5 mM	MgCl ₂
	0,5 %	Tween 20

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Erforschung des menschlichen Genoms hat durch eine Entdeckung im Jahre 1985 eine entscheidende Wende erfahren. In diesem Jahr entwickelte Kary Mullis eine neue Methode zur gezielten Vervielfältigung bestimmter Desoxyribonukleinsäure-(DNA-)Abschnitte, die sogenannte Polymerasekettenreaktion (PCR), für deren Entdeckung er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt.

Zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten mit Hilfe der PCR benötigt man als Starter Oligonukleotidprimer, also kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen, die zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize komplementär sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter geeigneten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so

neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Durch zyklische Wiederholung der Reaktion vermehrt sich die DNA exponentiell, da die in der vorherigen Reaktion neu synthetisierten DNA-Stränge in der nächsten Reaktion zusätzlich als Matrize dienen. Alle DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor.

Anfängliche Schwierigkeiten dieser Methode, die zunächst eine Automatisierung der PCR und damit eine Routineanwendung verhinderten, wurden im wesentlichen durch zwei neue Technologien behoben:

1. Durch die Entwicklung und den Einsatz von hitzestabilen DNA-Polymerasen wurde das Verfahren entscheidend vereinfacht, da die Polymerase nur noch einmal – zu Beginn der PCR - hinzugegeben werden mußte. In dieser Arbeit wurde eine DNA-Polymerase aus einem gentechnisch veränderten Bakterium, dem *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verwendet.
2. Durch die Entwicklung von Geräten, die die Steuerung der verschiedenen Temperaturen selbständig übernehmen, konnten Arbeitsaufwand und Fehlerquote entscheidend gesenkt werden.

Die Polymerase-Kettenreaktion vollzieht sich prinzipiell in drei Schritten:

1. Zunächst wird die DNA-Probe aufgeschmolzen. Man spricht hierbei vom DNA-Template, welches die zu amplifizierende Ausgangs-DNA bezeichnet.
2. Hybridisierung, also Anlagerung (=Annealing) der Primer mit dem nun einzelsträngigen DNA-Template.
3. Verlängerung der hybridisierten Primer durch die DNA-Polymerase (= Polymerisation).

Jeder dieser Schritte findet bei einem unterschiedlichen Temperaturoptimum statt. Die Denaturierungstemperatur betrug 95°C. Sehr wichtig und unterschiedlich ist die Auswahl des Temperaturoptimums für die Anlagerung der Primer an das Template, die sogenannte Annealing-Temperatur. Je niedriger diese gewählt wird, desto leichter hybridisieren die Primer mit dem Template, so daß die Anzahl an unspezifischen Hybridisierungen dementsprechend höher ist. Daher wurde die Annealing-Temperatur am Robocycler optimiert, um einen möglichst hohen Grad an spezifischen Hybridisierungen zu erreichen.

Die Polymerisationstemperatur lag stets bei 72°C, da diese Temperatur das Optimum für die verwendete Taq-Polymerase und Amplitaq-Gold darstellt.

Ein Durchgang der oben genannten drei Schritte wird als Zyklus bezeichnet, wobei pro PCR die Schritte 30-40 mal wiederholt werden. Da das jeweils amplifizierte DNA-Fragment im nächsten Zyklus zugleich wieder als neue Matrize dient, führt eine solche Wiederholung der Zyklen zu einer 30-40-fachen Amplifikation des ursprünglichen DNA-Fragmentes. Eine weitere Erhöhung der Zykluszahl führt allerdings zu einer starken Vermehrung unspezifischer DNA-Fragmente, so daß hierauf verzichtet wurde.

Ein so erhaltenes PCR-Produkt konnte direkt weiterverarbeitet werden oder wurde bis zur Weiterverarbeitung bei – 4°C gekühlt.

Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes (Mastermix):

H ₂ O	14,75 µl
Vorwärtsprimer	1 µl (Konzentration 10 µM)
Rückwärtsprimer	1 µl (Konzentration 10 µM)
10 x PCR-Puffer*	2,5 µl
dNTPs	2 µl
Taq-Polymerase**	0,15 µl
DNA-Template	2,5 µl

* Der 10 x PCR-Puffer von New England Biolabs beinhaltet:

0,67 M Tris-HCl (pH 8,8)

0,067 M MgCl₂

0,166 M Ammoniumsulfat.

** Anstelle der bei der Optimierung der Methode eingesetzten Taq-Polymerase wurde später als Polymerase die gentechnisch hergestellte Amplitaq Gold von Perkin-Elmer verwendet, die Primerfehler vermindert und so zu einer höheren Ausbeute spezifischer PCR-Produkte führt. Hierbei wurde die Menge der Polymerase auf 0,1 µl je Probe reduziert. Um das Gesamtvolumen beizubehalten, wurde die Differenz mit H₂O aufgefüllt.

Der Ansatz wurde in 0,2 ml MicroAmp reaction tubes pipettiert, wobei die Taq-Polymerase erst zum Schluß direkt vor dem Starten der PCR-Zyklen hinzugegeben werden durfte.

Um Verdunstungen und Verunreinigungen des PCR-Produktes zu vermeiden, wurde der komplette PCR-Ansatz anschließend mit zwei Tropfen Bayol F Mineralöl überschichtet und in das PCR-Gerät inkubiert.

Bei der Auswahl der Primer gab es einige Punkte zu beachten. Ihre Länge sollte zwischen 20 und 30 Nukleotiden betragen, da die Spezifität in diesem Bereich am höchsten ist, die Primerpaare sollten an ihren 3'-Enden nicht komplementär sein, um die Ausbildung sogenannter Primerdimere zu vermeiden und sie sollten sich nach Möglichkeit vor oder hinter einer kodierenden Sequenz befinden, um so die Spezifität der PCR zu erhöhen.

Als Primer wurden folgende Sequenzen ausgesucht und von der Firma TIB Molbiol bezogen:

Vorwärtsprimer:

Primer F1 5´-GCT TGT TCG GGG CGC TCC GCT G

Rückwärtsprimer:

Primer R1 5´-GGC TCA CAG GCT CCC CGC CG

Primer R1a 5´-GCC CCG CCC CGC TCC GCC CG

Primer R1b 5´-CAG CCA CTA CTG CAC GTC CGC C

Primer R1c 5´-CCG GAC CGT GGT GCC TCA GAG G

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden die verschiedenen Primer auf ihre Funktionstüchtigkeit hin untersucht und deren optimale Annealing-Temperatur ermittelt. Hierzu wurden die Proben im Robocycler inkubiert, mit dem es möglich ist, die PCR-Zyklen zugleich unter zwölf verschiedenen Temperaturen – in diesem Fall in 2er Schritten von 50 – 72°C – ablaufen zu lassen, um die Temperatur zu ermitteln, bei der das spezifische PCR-Produkt quantitativ am größten ist und die unspezifischen Produkte nur eine geringe Ausbeute aufweisen.

Nach Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur wurde die PCR auf dem TRIO-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt.

Die Standard-PCR-Bedingungen waren hierbei:

Denaturierung	95° C	3 min	
Denaturierung	95° C	30 sec]
Annealing	66° C	30 sec	40 Zyklen
Polymerisation	72° C	30 sec]
Stabilisierung	72° C	2 min	
Lagerung	10° C	∞	

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden bei -4° C gekühlt oder direkt weiterverarbeitet.

2.2.4 Polyacrylamidgele

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurden Polyacrylamidgele verwendet, die gegenüber Agarose-Gelen einige Vorteile besitzen:

1. Sie haben eine größere Auflösung, so daß selbst kleine Unterschiede der Basenpaarlänge des PCR-Produktes noch wahrgenommen werden können. Dies war bei dieser Arbeit von besonderer Wichtigkeit, da das PCR-Produkt selbst nur eine Länge von 133 bp aufwies und sich durch die Polymorphismen nur um 3-6 bp unterschied.
2. Die aus Polyacrylamidgelen isolierte DNA besitzt einen hohen Reinheitsgrad, so daß sie z.B. aus dem Gel herausgeschnitten, erneut eluiert und anschließend reamplifiziert werden kann, um die Herkunft unspezifischer Nebenprodukte zu analysieren.

Ein Nachteil der Polyacrylamidgele besteht in ihrer Gesundheitsgefährdung, da man zu ihrer Herstellung gelöstes Acrylamid benötigt, ein starkes Nervengift, das über die Haut aufgenommen wird. Auch das polymerisierte Acrylamid der Gele enthält noch geringe Mengen unpolymerisiertes Acrylamid.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen negativen Ladung, ist aber auch von der Konzentration – also der Porengröße – und der Menge an

Quervernetzungen der Gele abhängig, da kleine Moleküle seltener mit der Gelmatrix kollidieren und somit schneller vorankommen als große Moleküle.

Herstellung der Gele

Für diese Arbeit wurden Glasplatten in der Größe 100 mm x 260 mm x 5 mm und 200 mm x 260 mm x 5 mm verwendet, die einreihig mit 40-44 Taschen versehen waren.

Vor ihrem ersten Gebrauch wurden die Glasplatten mit Repel-Silane ES eingerieben und mit Ethanol gereinigt. Hierdurch wurde ihre Oberfläche fett- und staubfrei sowie hydrophob, so daß die Klebestreifen, die als Aussparungen für die späteren Geltaschen dienten, besser haften blieben, andererseits das fertige Gel nicht an dem Glas haften blieb.

Nach dieser Vorbehandlung war es ausreichend, die Glasplatten zwischen ihrem Gebrauch lediglich mit H₂O zu reinigen.

Anschließend wurde eine GelBond-Folie mit ihrer hydrophoben Seite auf die nicht beklebte Glasplatte aufgebracht, eventuelle Luftblasen mit dem Roller ausgestrichen, die Glasplatten übereinandergelegt und mit den Glasplattenklemmen zusammengehalten.

Zur Herstellung der Gele wurde – je nach gewünschter Konzentration- folgender Ansatz vorbereitet:

1,8 g	Harnstoff
6 ml	5 x TBE-Puffer*
12 ml	Acrylamidlösung
auf 30 ml	H ₂ O

Kurz vor dem Gießen der Gele wurde noch

48 µl 40 % Ammoniumpersulfat (APS) und

24 µl TEMED

zu dem Ansatz hinzugegeben, mittels Magnetrührer durchmischt und mit einem 50 ml Eppendorf-Combitip möglichst blasenfrei zwischen die Glasplatten verbracht. Nach circa einer Stunde waren die Gele auspolymerisiert, das Polyacrylamidgel blieb auf der GelBond-Folie haften und konnte weiterverwendet werden.

* Der 5 x TBE-Puffer bestand aus:

55 g	Borsäure
107,7 g	Tris-phosphat
9,3 g	EDTA
in 2 l	H ₂ O

Um den optimalen Vernetzungsgrad der Gele herauszufinden, bei dem sich die PCR-Produkte am eindeutigsten auftrennen, wurde mit verschiedenen Ansätzen der Acrylamidlösung gearbeitet (T₃₀C_{0,5}; T₃₀C₂; T₃₀C₄; T₁₂C₂; T₁₂C₃; T₁₂C₄; T₁₅C₂; T₁₅C₃; T₁₅C₄).

** Für den optimalen Vernetzungsgrad T₁₅C₄ wurden 24,4 g Acrylamid und 1,2 g Bis-Acrylamid in 100 ml H₂O gelöst. Bei anderen Vernetzungsgraden wurde die Konzentration des Bis-Acrylamids und des Acrylamids entsprechend verändert.

Zur Austestung der optimalen Acrylamidkonzentration wurde mit Konzentrationen von 8%, 12% und 16% gearbeitet, wobei eine optimale Konzentration von 12% ermittelt wurde.

2.2.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient dem Auftrennen der PCR-Produkte nach ihrer Größe und ihrer Sekundärstruktur.

Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurden die Elektrophoresekammern auf 5°C gekühlt und die Porzellanplatten der Kammern mit H₂O befeuchtet. Die zuvor gegossenen und vollständig auspolymerisierten Polyacrylamidgele wurden nun möglichst blasenfrei auf die Porzellanplatte aufgebracht. Um während der Elektrophorese ein möglichst konstantes pH-Milieu zu gewährleisten, wurde sowohl an der Kathoden- als auch der Anodenseite entlang des Kontaktdrahtes ein Stapel aus 10 Lagen Filterpapier auf das Gel gelegt, der zuvor in 1 x TBE-Puffer durchtränkt wurde. Dieser Puffer wurde auch als Laufpuffer für die Elektrophorese verwendet, so daß die Elektrophoresekammer ebenfalls mit 1 x TBE-Puffer befüllt war.

In die Auftragstaschen wurden nun jeweils 5 µl des PCR-Produktes überführt, wobei meist die zwei obersten und untersten Taschen nicht für die PCR-Produkte zur Verfügung standen. Hierin wurde je zweimal als Ablesehilfe für die Größe des PCR-Produktes 5 µl eines 1%igen 10 bp DNA-Leiters verbracht. Die restlichen zwei Taschen wurden mit 5 µl Blaumarker (Bromphenolblau in 1 x TBE-Puffer) befüllt, mit dem das Laufverhalten der Proben während der

Elektrophorese kontrolliert werden konnte. Nach Anschließen der Kontakte und Aufbringen der Schutzvorrichtung konnte die Elektrophorese nun gestartet werden, wobei als Energiequelle ein Power Supply 200 der Firma Bio-Rad verwendet wurde.

Die Elektrophorese-Bedingungen waren:

Temperatur	5 ° C
Spannung	1000 V
Stromstärke	150 mA
Leistung	60 W
Dauer	2 h

Nach erfolgter Elektrophorese konnten die DNA-Fragmente durch eine Silbernitratfärbung sichtbar gemacht werden oder das Hauptprodukt der PCR aus dem Gel isoliert werden, um es einer Reamplifikation zuzuführen und damit von anderen Amplifikaten zu trennen, bzw. die Herkunft der PCR-Nebenprodukte zu detektieren.

So lassen sich anhand der PCR verschiedene Informationen ableiten:

1. Der Nachweis, daß die gesuchte DNA in der Probe vorhanden ist und ob sie verändert ist.
2. Eine ungefähre Abschätzung der quantitativen Ausbeute der PCR.
3. Eine Sequenzanalyse

2.2.6 Silbernitratfärbung

Die Silbernitratfärbung dient der Visualisierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte.

Nach Ablauf der Gelelektrophorese und Abschaltung der Stromzufuhr wurde das Gel kurz mit H₂O gespült und in eine Entwicklerschale verbracht, die durch einen Tischshaker mit niedriger Geschwindigkeit geschüttelt wurde. Die Entwicklerschale war mit 200 ml Fixierlösung gefüllt. Nach 5-10 minütiger Inkubation des Gels in der Fixierlösung und anschließendem kurzen Waschen in H₂O wurde das Gel in eine lichtdichte Färbeschale überführt, die mit 200 ml

gekühlter 0,2 % AgNO_3 -Lösung gefüllt war. Unter abermaligen Schütteln wurde das Gel hier für 20 min gefärbt, wonach es gründlich unter H_2O gewaschen wurde und abermals für 10-15 min in die Entwicklerschale überführt wurde, die mit 200 ml Entwicklerlösung gefüllt war. Nachdem die Färbung ausreichend entwickelt war, wurden die Gele unter H_2O gewaschen, in eine Plastikfolie eingeschweißt, beschriftet und mittels Scanner dokumentiert.

Herstellung der Lösungen für die Silbernitratfärbung:

Fixierlösung:	200 ml	Ethanol
	40 ml	Hac (Eisessig)
	auf 2 l	H_2O
Färbelösung:	4 g	AgNO_3
	auf 2 l	H_2O
Entwicklerlösung:	30 g	NaOH
	200 mg	NaBH_4
	auf 2 l	H_2O
kurz vor Verwendung	1 ml	37 % Formaldehyd

2.2.7 Reamplifikation des PCR-Produktes

Das Ergebnis einer PCR kann durch viele verschiedene Faktoren – positiv wie negativ – beeinflusst werden. Diese Einflüsse können sich entweder in der quantitativen Ausbeute des PCR-Hauptproduktes oder in der zusätzlichen Ausbeute von Nebenprodukten äußern. Häufigste Ursache hierfür ist die Einschleppung von inhibitorischen bzw. verunreinigenden Substanzen in die Probe. Dies kann bereits bei der Gewinnung des Blutes in Heparin-haltige Monovetten erfolgen, da Heparin die PCR stark hemmt, aber auch bei der DNA-Extraktion z.B. durch ungenügende Inaktivierung von Proteinase K erfolgen.

Bei etlichen DNA-Proben kam es nach der PCR zu Amplifikaten unterschiedlicher Größe, wobei das erwartete Fragment quantitativ zwar stets den größten Anteil ausmachte, es jedoch bei einigen Proben zur Entstehung von Nebenprodukten kam, deren Herkunft durch folgende Kontrollen detektiert werden sollte:

1. PCR ohne DNA, um die Verunreinigung der Zutaten mit DNA auszuschließen
2. PCR mit weniger Zyklen
3. Austestung verschiedener Hybridisierungstemperaturen
4. Negativkontrollen
5. Wiederholung der PCR unter gleichen Bedingungen
6. Reamplifikation des PCR-Produktes, um herauszufinden, ob die Nebenprodukte während der PCR entstehen

Ursache solcher Nebenprodukte können Verunreinigungen der DNA-Probe oder des PCR-Ansatzes sein, sie können genauso gut aber auch während der PCR z.B. durch die Ausbildung von Primerdimeren entstehen, also Artefakten, die auftreten, wenn die Polymerase den einen Primer komplementär zum anderen Primer oder zu sich selbst synthetisiert.

Hierzu wurde die entsprechende Bande des PCR-Hauptproduktes nach erfolgter Gelelektrophorese noch vor der Silbernitratfärbung mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA zusammen mit der herausgetrennten Gelsubstanz in 50 µl H₂O für mindestens drei Stunden bei 65°C im UNO inkubiert. Von der Lösung wurden 2,5 µl als neues DNA-Template für einen PCR-Mastermixansatz verwendet und einer abermaligen PCR zugeführt. Das Ergebnis dieser Reamplifikation wurde wie oben beschrieben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

2.2.8 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

Mit Hilfe des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) kann ein PCR-Produkt in kleinere Fragmente aufgespalten werden, um geringe Veränderungen der DNA-Primärstruktur noch detektieren zu können. Hierbei erkennen bakterielle Restriktionsendonukleasen spezifische DNA-Sequenzen und hydrolysieren an definierten Stellen die Phosphodiester-Bindungen der DNA-Stränge. Bis heute wurde eine Vielzahl von Restriktionsenzymen gereinigt und charakterisiert, ihre Namen bestehen aus einer Abkürzung des Wirtsorganismus (z.B. Hae für *Haemophilus aegypticus*) und einer römischen Zahl, falls mehr als ein Restriktionsenzym produziert wird¹²⁶.

Der Ansatz für den RFLP war wie folgt:

Restriktionspuffer	9,4 µl
Restriktionsenzym	0,6 µl
PCR-Produkt	10 µl

Als Restriktionsenzyme dienten Cfo I, Hae I und Hae II, wobei die letzten beiden in Form eines double-digest kombiniert wurden. Hierbei wurde soviel beider Enzyme hinzugegeben, daß die Gesamtmenge an Enzym die Menge im obengenannten Ansatz nicht überstieg.

Der Ansatz wurde in ein TRIO-Thermoblock verbracht, mit dem Heizdeckel, der eine Temperatur von 85°C hatte, verschlossen und für 2 h 30 min bei 37°C inkubiert.

Die verwendeten Restriktionspuffer L und M von Boehringer Ingelheim sowie NEB 2 von New England Biolabs hatten folgende Eigenschaften:

Restriktionspuffer L:	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-Hcl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	2-Mercaptoethanol

Restriktionspuffer M und NEB 2:	50 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT

Eigenschaften der Restriktionenzyme

Cfo I	5' - C [↓] GCG - 3'	oder	3' - GCG [↓] C - 5'
Hae II	5' - GCGC [↓] - 3'	oder	3' - [↓] CGCG - 5'
Hae III	5' - GG [↓] CC - 3'	oder	3' - CC [↓] GG - 5'

Nach Inkubation im TRIO-Thermoblock wurden die Proben erneut einer Polyacrylamidgelelektrophorese zugeführt und - wie unter 2.2.6 beschrieben - mit Hilfe der Silberfärbung visualisiert.

2.2.9 Sequenzierung

Zur Qualitätssicherung wurde beispielhaft eine Patientenprobe sequenziert, um sicherzustellen, daß das erhaltene PCR-Produkt auch das gewünschte DNA-Fragment darstellt, da Primer auch an anderen gleich konfigurierten DNA-Abschnitten schneiden können.

In dieser Arbeit benutzte man für die Sequenzierung die Methode des basenspezifischen Kettenabbruches nach Sanger. Die Sequenzierung beinhaltet verschiedene Schritte:

Aufreinigung

Cycle Sequencing

Nukleotid-Entfernung

Elektrophorese

Aufreinigung

Hierbei wird das PCR-Produkt von überschüssigen Nukleotiden, von den Primern und der Taq-Polymerase gereinigt, damit die gereinigte DNA später der Sequenzierung zugeführt werden kann. Zunächst wird das PCR-Produkt vom überschichteten Bayol-Öl getrennt.

Die eigentliche Aufreinigung des gewonnenen PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe des PCR-Purifikation-Kits von Qiagen.

Hierzu wurde das PCR-Produkt mit dem PB-Puffer im Verhältnis 1:5 gemischt und in eine QIAquick-Säule überführt, die in einer Sammeltube steht. Das Reaktionsgemisch wurde nun für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Silica Gel Membran der QIAquick-Säule adsorbiert bei der Zentrifugation die DNA bis zu einer Menge von 10 µg, so daß sich in der Sammeltube der abzentrifugierte Rest aus PCR-Ansatz ohne DNA und PB-Puffer befindet, der verworfen wird. Die QIAquick-Säule wurde nun in eine neue Sammeltube gestellt.

In einem weiteren Reinigungsschritt wurden 750 µl PE-Puffer, der zuvor mit Ethanol aufgefüllt worden war, auf die Säule gegeben und zweimal für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, wonach die Sammeltube abermals verworfen wurde. Nun wurde die QIAquick-Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Elution der aufgereinigten DNA aus der Membran der

QIAquick-Säule wurde vorsichtig 50 µl PE-Puffer in das Zentrum der Säule pipettiert, für 1 min inkubiert und abermals für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Die aufgereinigte DNA befand sich nun im Eppendorf-Gefäß, die QIAquick-Säule wurde verworfen.

Cycle Sequencing

Das Cycle Sequencing entspricht einer linearen Amplifizierung der DNA, da man nur einen einzigen Primer verwendet, wobei die Sequenzabschnitte nicht vollständig amplifiziert werden, sondern der Vorgang mit Hilfe von Didesoxynukleotiden während ihrer Verlängerung durch die Taq-Polymerase bei statistisch berechenbarer, unterschiedlicher Sequenzlänge abgebrochen wird. Die Konzentration der Didesoxynukleotide muß so gewählt werden, daß am Ende der Reaktion alle verschiedenen Sequenzlängen in für die anschließende Auswertung ausreichender Menge vorliegen. Im Gegensatz zur PCR kann hier allerdings das entstehende Tochtermolekül nicht als neues Template zur Verfügung stehen.

Für das Cycle Sequencing wurden 2,5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt in eine GeneAmp-Tube pipettiert und jeweils 0,5 µl des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers hinzugegeben. Das Gemisch wurde jeweils mit 2 µl Ready-to-use-Dye-Terminator-Mix versehen und in den TRIO-Thermoblock überführt.

Die Bedingungen für das cycle sequencing:

95° C	2 min	
95° C	15 sec	┌
60° C	20 sec	30 Zyklen
60° C	30 sec	└
4° C	∞	

Nukleotid-Entfernung

Die Entfernung überschüssiger Nukleotide wurde mit Hilfe des Nucleotide Removal Kit von Qiagen durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl PCR-Produkt mit 50 µl PN-Puffer durchmischt, in eine QIAquick-Säule, die in einem Sammel tube steht, überführt und für eine Minute bei 6000

rpm zentrifugiert. Nach Überführung der QIAquick-Säule in eine neue Sammeltube wurden 750 µl PE-Puffer zugegeben und abermals bei 6000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. In einer neuen Sammeltube wurde das Gemisch danach für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Hiernach wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gestellt, 100 µl H₂O in das Zentrum der Säule pipettiert und nach einer einminütigen Inkubation für eine weitere Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.

In einer Speed Vacuum Schleuder („Centrivac“) wurde das Produkt anschließend für mindestens zwei Stunden eingedampft.

Das eingedampfte Reaktionsprodukt wurde in 6 µl Formamid EDTA (bestehend aus 5 µl Formamid und 1 µl 50 mM EDTA) aufgenommen, für zwei Minuten bei 95° C erhitzt und sofort im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden die Proben aufgetragen.

Sequenziergel

Zunächst wurden die Gelplatten mit Leitungswasser und Spülmittel (Alconox) gereinigt und mit Kimwipes trockengerieben. Zur Entfernung von Harnstoffresten wurden die Platten hiernach mit H₂O dest. abgespült. Anschließend wurden die Platten in korrekter Weise aufeinandergelegt und mittels Glasplattenklemmen zusammengehalten.

Für die Sequenzierung wurde ein 6 % Polyacrylamidgel nach folgender Rezeptur hergestellt:

Ansatz:	33,0 g	Harnstoff
	14,0 ml	5 x TBE-Puffer
	19,0 ml	H ₂ O
	10,0 ml	Acrylamidlösung

Der Ansatz wurde in ein Bechergefäß überführt und unter mäßigem Rühren auf 50° C erhitzt. Kurz vor dem Gießen des Gels wurden noch 28 µl TEMED und 175 µl 10% Ammoniumpersulfat hinzugegeben und das Gel möglichst blasenfrei zwischen den Glasplatten gegossen. Zur Bildung einer geraden Kante an der Plattenoberseite wurde ein Vorkamm eingesetzt und das Gel in ca. 1 Stunde auspolymerisiert.

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurden die Klemmen entfernt und die Glasplatten in den Sequenzer 373 A eingesetzt. In Ablesehöhe des Lasers wurden die Glasplatten abermals mit H₂O gereinigt, um letzte Verunreinigungen zu entfernen. Die Reinheit der Glasplatten wurde anschließend mit Hilfe des Rechners überprüft und die Reinigung solange wiederholt, bis am Rechner kein Hintergrund mehr erkennbar war.

Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer von GIBCO verwendet und nach Einsetzen der oberen Pufferkammer beide Pufferkammern eingefüllt. Der Vorkamm wurde gezogen und der Haifischkamm unter Beachtung der Kerbe mittig eingesetzt. Nach Spülen der so gebildeten Taschen mit TBE-Puffer wurden je 2 µl der Proben in die Taschen aufgetragen.

Der Vorlauf erfolgte über eine Stunde, die Elektrophorese über Nacht für 10 h bei konstant 40 W.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit Hilfe der Tetra Analyze Software von SoftGene ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenetablierung

Eine Methode der Detektion von Trinukleotid-Expansionen der zellulären GPX beschrieben Shen et al.⁸². Sie bestimmten die Anzahl der Repeats mittels PCR und anschließender Autoradiographie, bei der Radioisotope, in diesem Fall 1µCi [α -³²P]dCTP, in die Sequenzierungsprimer eingebaut wurden.

Diese Methode hat drei wesentliche Nachteile:

1. Sie erweist sich als sehr zeitintensiv, da vier Sequenzierungsreaktionen nötig sind (je eine für jeden der dNTP-Terminatoren). Durch die hohe Anzahl an Arbeitsschritten ist die Gefahr von Meßungenauigkeiten dementsprechend erhöht.
2. Durch die hohe Zeitintensität der Methode ist sie mit einem hohen materiellen Aufwand verbunden.
3. Aufgrund der energiereichen β -Strahlung bei dieser Methode ist auch das gesundheitliche Risiko zu berücksichtigen.

So stand zu Beginn dieser Arbeit die Etablierung einer einfachen, kostengünstigen und weniger gesundheitsschädlichen Methode zur Detektion der Trinukleotid-repeats der GPX-1.

3.1.1 Primerwahl

Bei der Suche nach der Primerwahl entschied man sich in dieser Arbeit für einen Vorwärts- und vier Rückwärtsprimer, deren Struktur im Kapitel 2.2.3 bereits dargestellt ist. Ihre jeweiligen Schnittstellen im betroffenen 1. Exon der kodierenden Sequenz von GPX-1 ist in nachfolgender Abbildung dargestellt:

```

2460 GCCACGTGAC CCGCCGGCCA GTTAAAAGGA GGCGCCTGCT
      |----- F1 ----->|
2500 GGCCTCCCCT TATAGTGCTT GTTCGGGGCG CTCCGCTGGC

2540 TTCTTGGACA ATTGCGCCAT GTGTGCTGCT CGGCTAGCGG

2580 CGGCGGGCGG GGCCCAGTCA GGTGTATGCC TTCTCGGCGC
      |<----- R1 -----|
2620 GCCCGCTGGC CGGCGGGGAG CCTGTGAGCC TGGGCTCCCT
                                     |<-----
2660 GCGGGGCAAG GTACTACTTA TCGAGAATGT GGCGTCCCTC
      — R1c —————|
2700 TGAGGCACCA CGCTCCGGGA CTACACCCAG ATGAACGAGC

2740 TGCAGCGGCG CCTCGGACCC CGGGGCCTGG TGGTGCTCGG
                                     |<-----
2780 CTTCCCGTGC AACCAGTTTG GGCATCAGGT GCGCCGGGCG
      — R1a —————| |<----- R1b —————|
2820 GAGCGGGGCG GGGCGGGGGC GGACGTGCAG TAGTGGCTGG

2860 GGGCGCCGCG GGTGTGCTGG TGGGTGCCGT CGCTCCATGC

```

Abb. 4: GPX-1 Gensequenz von bp 2460-2899; 1. Exon grau unterlegt; Trinukleotid-Repeats fett, die verwendeten Primer sind als Pfeile eingetragen

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß sich für jede Primerkombinationen PCR-Produkte – je nach Anzahl der Trinukleotid-Repeats von unterschiedlicher Länge ergaben:

- F1/R1: 133 bp (bei drei GCG-Repeats)
- F1/R1a: 319 bp (bei drei GCG-Repeats)
- F1R1b: 343 bp (bei drei GCG-Repeats)
- F1/R1c: 203 bp (bei drei GCG-Repeats)

Bei der Kombination der unterschiedlichen Primer zeigten sich folgende Ergebnisse, wobei die PCR-Produkte zunächst auf 100x260x5 mm großen Polyacrylamid-(PAA)gelen mit dem Vernetzungsgrad T₃₀C₄ in 12%iger Konzentration aufgetragen wurden:

F1/R1: Die qualitativen und quantitativen Ergebnisse der PCR waren gut, allerdings zeigte sich, daß sich die PCR-Produkte im PAA-Gel zu wenig auftrennen, so daß sie sich nicht eindeutig klassifizieren ließen. Ein Beispiel für diese Primerkombination zeigt die nachstehende Abbildung:

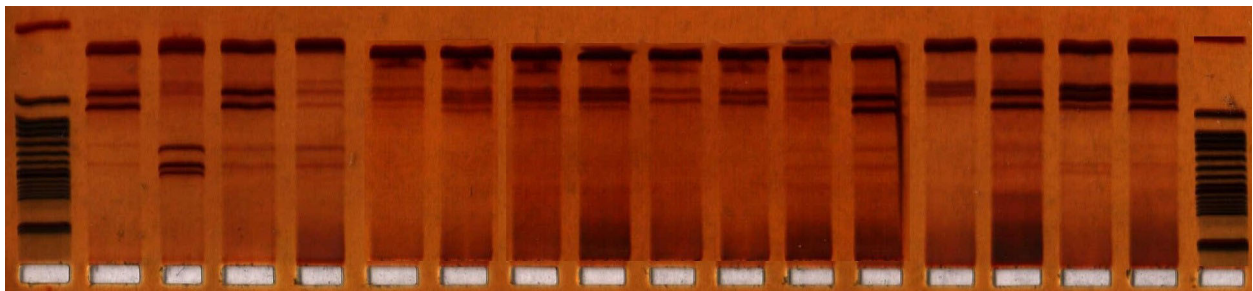


Abb. 5: PCR mit den Primern F1/R1 (Proben der Kontrollgruppe); Elektrophoresebedingungen 5° C, 60 W, 1000 V, 100 mA, 1 h 40 min, aufgetragen auf kleines T₁₂C₄-Gel; Spur 1 und Spur 18: 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2 bis Spur 17: unterschiedliche DNA-Proben; das PCR-Fragment mit den Trinukleotid-Repeats befindet sich in der obersten, dicken Bande

F1/R1a/R1b/R1c: Die Kombination des funktionierenden Vorwärtsprimers mit neuen Rückwärtsprimern hatte das Ziel, das PCR-Produkt zu verlängern, um so die Spezifität der PCR zu erhöhen und die Klassifizierung der PCR-Fragmente zu erleichtern.

Trotz zahlreicher Versuche, unter verschiedenen Bedingungen die optimale Annealing-Temperatur der Primer am Robocycler herauszufinden, zeigten sich bei diesen Kombinationen keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Schon die quantitative Ausbeute der PCR-Produkte reichte nicht aus, um mit diesen Primerkombinationen aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

So wurde anschließend wieder zu der funktionierenden Primerkombination F1/R1 zurückgegangen und versucht, das PCR-Ergebnis auf andere Art zu optimieren, um die unterschiedlichen Allele sichtbar zu machen.

Dies konnte zunächst allein durch Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur nicht erreicht werden. Auch eine Ermittlung der optimalen Elektrophoresebedingungen (schließlich

5°C, 500 V, 50 mA, 25W, 60 min) brachte keine wesentlich bessere Auftrennung der PCR-Produkte.

So wurde schließlich versucht, auf einem anderen Weg das PCR-Produkt zu verkleinern, um eine bessere Auftrennung der unterschiedlichen Allele zu erreichen.

Hierzu bediente man sich der Methode des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP).

3.1.2 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

Bei der Methode des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) schneiden spezifische Restriktionsendonukleasen das PCR-Produkt an bestimmten Stellen und zerteilen es somit in eine – je nach verwendetem Restriktionsenzym – unterschiedliche Anzahl von Fragmenten. Da diese Fragmente ein kleineres Molekulargewicht besitzen, fällt eine Auftrennung im PAA-Gel leichter und kleine Größenunterschiede der einzelnen Amplifikate lassen sich leichter detektieren.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, deren Endonuklease-Eigenschaften bereits in Kapitel 2.2.8 dargestellt wurden.

Nachstehende Grafik zeigt, an welchen Stellen die verwendeten Restriktionsenzyme das PCR-



Abb. 6: PCR-Produkt F1/R1 und die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme; Trinukleotid-Repeats fett dargestellt

Zunächst wurde ein RFLP mit dem Enzym Cfo I unternommen, wobei sich immer noch keine Unterschiede in der Basenpaargröße der verschiedenen Allele ausmachen ließ, so daß die Ergebnisse in dieser Form nicht zu verwerten waren.

Anschließend wurde ein sog. *double digest* unternommen, bei dem zwei verschiedene Restriktionsenzyme miteinander kombiniert werden um eine noch größere Fragmentierung des PCR-Produktes zu erreichen. Man verwendete hierzu die Restriktionsenzyme Hae I und Hae II. Hierbei ließ sich erstmalig makroskopisch ein verändertes Laufverhalten der unterschiedlichen Allele ausmachen, allerdings waren die Unterschiede der Allele sehr klein und damit schwer zu klassifizieren. Die nachfolgende Abbildung zeigt ein Beispiel hierfür.

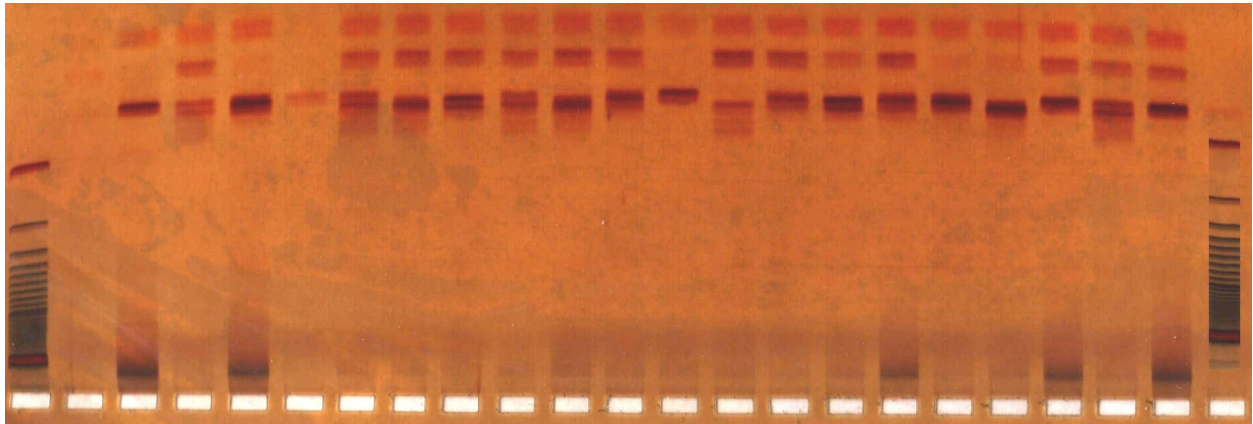


Abb. 7: RFLP des PCR-Produktes von F1/R1 mit Hae II und Hae III (Proben der Kontrollgruppe); Elektrophoresebedingungen 5° C, 60 W, 1000 V, 100 mA, 1 h 40 min; aufgetragen auf kleines T₁₂C₄-Polyacrylamid-Gel; Spur 1 und Spur 23: 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2 bis Spur 22: unterschiedliche DNA-Proben; anhand der dicken unteren Banden läßt sich das unterschiedliche Laufverhalten der Genotypen erkennen

So wurde nachfolgend versucht, durch eine Veränderung der Geleigenschaften das Laufverhalten der PCR-Fragmente zu optimieren. Ziel war es hierbei, das entscheidende PCR-Fragment mit den Trinukleotid-Repeats so aufzutrennen, daß die unterschiedlichen Allele genau auszuwerten waren.

3.1.3 Geloptimierung

Das Verhalten von geladenen Teilchen wie z.B. Nukleinsäuren im elektrischen Feld ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig.

Zunächst ist zwischen den Elektroden ein leitendes Medium notwendig, das zahlreiche negative wie positive Ionen enthält, so daß zwischen den Elektroden Strom fließen kann. Dies führt zur Elektrolyse des Wassers, so daß sich an der negativen Elektrode Wasserstoffgas und eine Base bilden, an der positiven Elektrode entstehen Sauerstoffgas und eine Säure. So kann sich die negativ geladene Nukleinsäure im elektrischen Feld zur positiven Elektrode bewegen, ein Vorgang, bei dem Energie in Form von Wärme frei wird („Joulesche Wärme“). Mit welcher Geschwindigkeit Nukleinsäuren wandern, hängt vor allem von der Spannung ab, die als „Anstoß“ für die Ladungen dient.

Daneben hängt die Geschwindigkeit der geladenen Moleküle zusätzlich von der Gesamtzahl der Ladungen und der Masse der einzelnen Moleküle ab. Je mehr negative Ladungen das Molekül besitzt, desto schneller ist seine Wanderungsgeschwindigkeit und je größer das Molekül ist, desto langsamer kommt es voran. Bei Nukleinsäuren führt das konstante Verhältnis von Ladung

und Größe – eine negative Ladung pro Phosphat in der Kette- zu einer konstanten Geschwindigkeit großer und kleiner Nukleinsäuren. So muß auf andere Weise versucht werden, unterschiedlich große Nukleinsäuren voneinander zu trennen. Dazu bedient man sich eines Molekularsiebes, in dem große Moleküle langsamer wandern als Kleine, da sie häufiger mit der Siebmatrix kollidieren. Als eine solche Siebmatrix dienen die PAA-Gele.

Polyacrylamid polymerisiert nach Zugabe eines Katalysators zu langen Ketten, die durch Zugabe eines Quervernetzers die oben beschriebene Siebmatrix bilden. Die Porengröße dieses Siebes läßt sich demnach durch eine Veränderung der Polyacrylamidkonzentration und der Quervernetzung beeinflussen.

In dieser Arbeit wurden Gele mit einer 12%, 15% und 30%igen Polyacrylamidkonzentration, sowie einer 0,5%, 2% und 4%igen Bis-Acrylamid-Konzentration als Quervernetzer verwendet.

Anhand der Abbildung 6 läßt sich erkennen, daß eine eindeutige Auftrennung der PCR-Produkte nicht möglich ist. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse ließen sich für eine wissenschaftliche Verwertung nicht exakt genug bestimmen.

So bestand der nächste Versuch darin, durch Veränderungen der Geleigenschaften und der Laufzeiten der Elektrophorese eine bessere Auftrennung zu erhalten, da sich so der Abstand zwischen den in der Gelmatrix hängengebliebenen Nukleinsäuren vergrößern wurde.

Die bis zu diesem Zeitpunkt für diese Arbeit verwendeten Gele wiesen jedoch nur eine Länge von 100 mm auf, so daß bei einer Verlängerung der Laufzeit die entscheidenden Fragmente am Gelende kumulieren würden und so eine Unterscheidung unmöglich wäre. Daher wurden nun Gele mit einer Länge von 200 mm verwendet, bei denen die Elektrophoresedauer von anfangs 60 min auf 1 h 40 min verlängert werden konnte.

Hierbei zeigte sich erstmalig die Möglichkeit einer exakten Zuordnung der gewonnenen PCR-Produkte. Die Genauigkeit ließ sich nun abermals durch eine Veränderung der PAA-Konzentration und der Quervernetzung optimieren, so daß schließlich die einzelnen Allele eindeutig zu bestimmen waren und die Ergebnisse verwertet werden konnten.

Die folgende Abbildung zeigt ein Beispiel für das optimale Ergebnis der PCR und macht die Beurteilung der Ergebnisse deutlich.

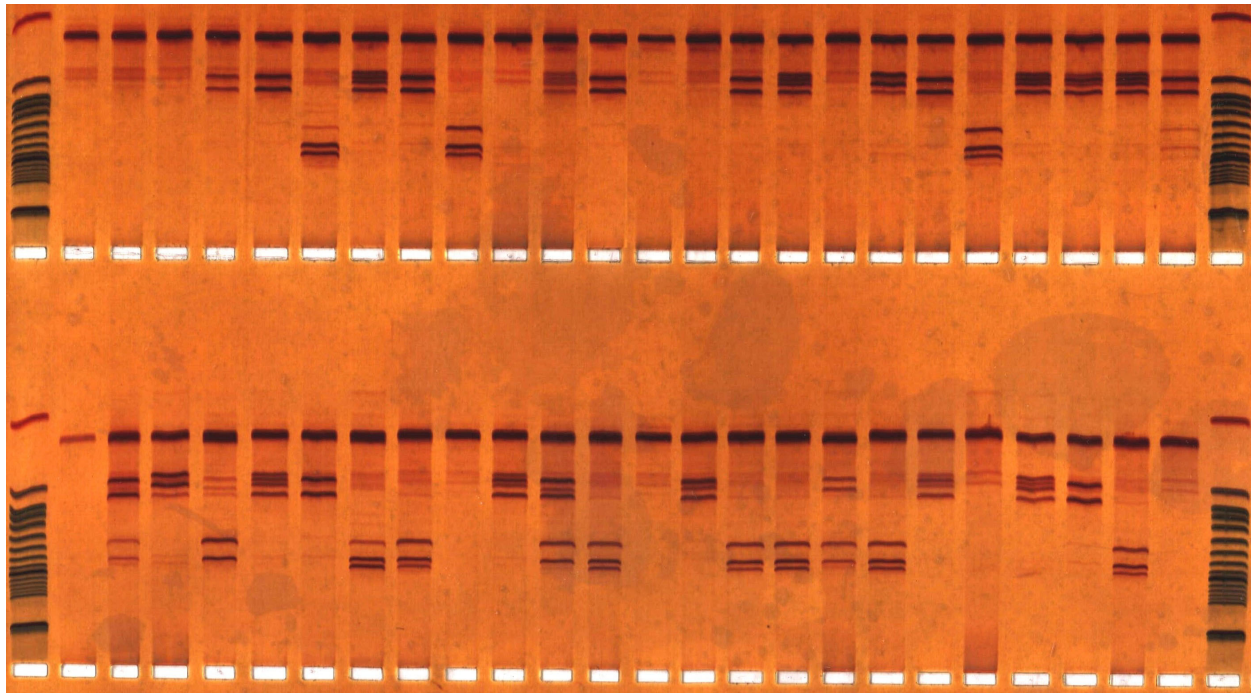


Abb. 8: PCR mit den Primern F1/R1 (Proben der Kontrollgruppe); aufgetragen auf ein großes T₁₅C₄-PAA-Gel Elektrophoresebedingungen 5° C, 60 W, 1000 V, 100 mA, 1 h 40 min; äußere Spuren: 100 bp-DNA-Leiter, dazwischen: unterschiedliche DNA-Proben; Unterscheidung erfolgt durch die Zusatzbanden, die für jeden Genotyp spezifisch sind

Analog hierzu zeigt die nachfolgende Abbildung die optimierten Bedingungen der Elektrophorese und der Polyacrylamidgele für den RFLP.

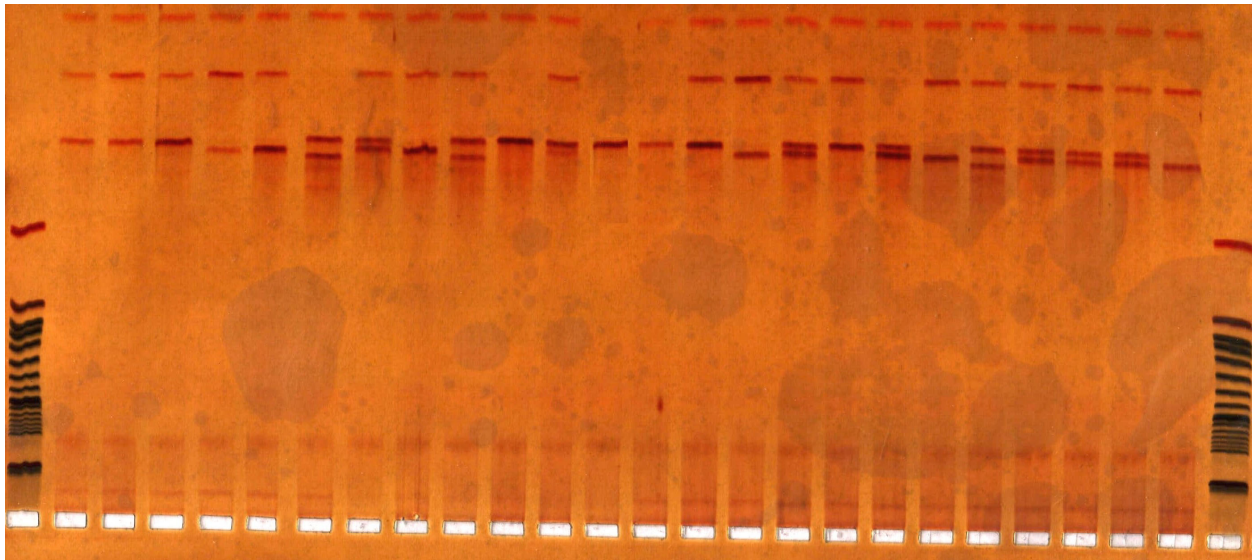


Abb. 9: RFLP des PCR-Produktes F1/R1 mit Hae II und Hae III (Proben der Kontrollgruppe); aufgetragen auf ein großes T₁₅C₄-PAA-Gel Elektrophoresebedingungen 5° C, 60 W, 1000 V, 100 mA, 1 h 40 min; Spur 1 und Spur 26: 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2 bis Spur 25: unterschiedliche DNA-Proben; die Unterscheidung ist durch das für jeden Genotyp spezifische Laufverhalten der kräftigsten Banden möglich

3.1.4 Sequenzierung

Die durch die PCR mit den Primern F1/R1 gewonnenen Amplikons wurden anschließend aus Gründen der Qualitätssicherung sequenziert. Hierbei wurde überprüft, ob durch die verwendeten Primer wirklich das gesuchte Fragment des 1. Exons der GPX-1 amplifiziert wurde oder ob die Primer an irgendeiner anderen Stelle des Genoms schneiden und somit ein völlig anderes Produkt amplifizieren, das zufällig eine ähnliche Länge aufweist wie das in dieser Arbeit gesuchte Fragment.

Für die Sequenzierung bediente man sich der in Kapitel 2.2.9 bereits beschriebenen Methode nach Sanger, wobei stellvertretend für die anderen Proben ein homozygotes PCR-Produkt sequenziert wurde.

Bei der Auswertung des sequenzierten PCR-Produktes zeigte sich, daß es sich zweifelsfrei um das gesuchte Fragment im 1.Exons des GPX-1-Gens handelt.

So wurde nachgewiesen, daß es sich bei dem PCR-Produkt um die gesuchte Gensequenz mit dem zu untersuchenden Trinukleotid-Repeat handelt.

3.2 Darstellung der optimierten Methode

So lassen sich abschließend folgende methodische Bedingungen für die optimale Auswertung des GCG-Repeats im 1. Exon der GPX-1 formulieren:

1. Ansatz des PCR-Mastermixes mit den oben beschriebenen Primern F1/R1 mit folgenden Konzentrationen:

H ₂ O	14,75 µl
Vorwärtsprimer	1 µl (Konzentration 10 µM)
Rückwärtsprimer	1 µl (Konzentration 10 µM)
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTPs	2 µl
Taq-Polymerase	0,15 µl
DNA-Template	2,5 µl

2. PCR des Ansatzes unter folgenden Bedingungen:

95° C	3 min	
95° C	30 sec	┐
66° C	30 sec	40 Zyklen
72° C	30 sec	└
10° C	∞	

3. RFLP des PCR-Produktes mit Hae II und Hae III für 2 h 30 min bei 37° C.

4. Elektrophorese der gewonnenen Produkte auf T₁₅C₄-PAA-Gelen unter folgenden Bedingungen:

Temperatur	5 ° C
Spannung	1000 V

Stromstärke	150 mA
Leistung	60 W
Dauer	2 h

5. Visualisierung der Ergebnisse mittels Silberfärbung.

3.3 Versuchsergebnisse

3.3.1 Patientenproben

Shen et al.⁸² ermittelten die Verteilung ihrer im Jahre 1994 bei 55 zufällig ausgewählten Proben gefundenen Trinukleotid-Expansion nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Sie fanden für die einzelnen Repeats folgende Häufigkeiten:

Allele	Häufigkeit	Allele	Häufigkeit
4/4	0,16	4/5	0,28
5/5	0,13	4/6	0,20
6/6	0,06	5/6	0,17

Abb. 10: Allel-Häufigkeiten der GPX-1 ermittelt nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz durch Shen et al. in Genomics 1994; 23, 292-294

So war das nächste Ziel dieser Arbeit nach der erfolgreichen Methodenetablierung die Überprüfung dieses durch Shen et al. ermittelten Verteilungsmusters. Hierzu wurde das Patientenkollektiv mittels der oben genannten PCR-Methode und anschließend RFLP durchuntersucht.

Folgende Abbildung zeigt den Ausschnitt eines Gels einer PCR, auf dem alle Genotypen der GPX-1 dargestellt sind. Die Unterscheidung erfolgt anhand der spezifischen Zusatzbanden, auf deren Herkunft in der Diskussion noch eingegangen wird.

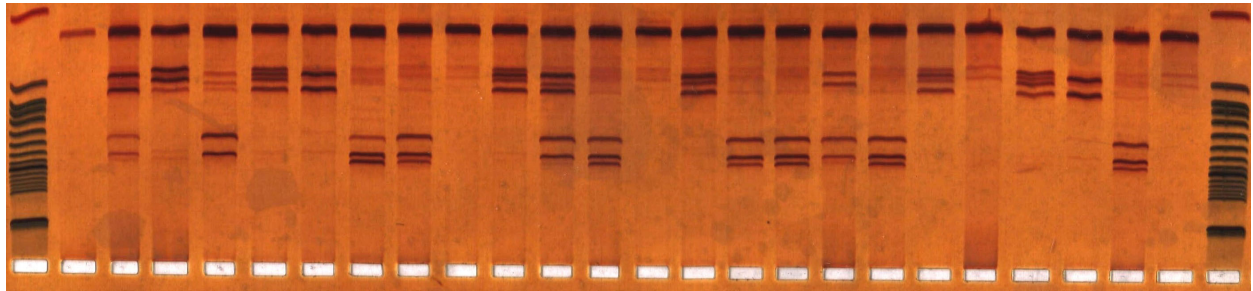


Abb. 11: PCR aller GPX-Genotypen; aufgetragen auf $T_{15}C_4$ -Gel; Spur 1: 100 bp-DNA-Leiter; Spur 3: Genotyp 5*5; Spur 3: Genotyp 4*5; Spur 4: Genotyp 6*6; Spur 5: Genotyp 4*5; Spur 6: Genotyp 5*5; Spur 7: Genotyp 4*6; Spur 8: Genotyp 4*6; Spur 9: Genotyp 4*4; Spur 10: Genotyp 4*5; Spur 11: Genotyp 5*6; Spur 12: Genotyp 4*6; Spur 13: Genotyp 4*4; Spur 14: Genotyp 4*5; Spur 15: Genotyp 4*6; Spur 16: Genotyp 4*6; Spur 17: Genotyp 6*6; Spur 18: Genotyp 4*6; Spur 19: Genotyp 4*5; Spur 20: Genotyp 4*4; Spur 21: Genotyp 4*5; Spur 22: Genotyp 5*5; Spur 23: Genotyp 4*6; Spur 24: Genotyp 4*4; Spur 24: 100 bp-DNA-Leiter

Analog hierzu zeigt nachstehende Abbildung das Gel eines RFLP, auf dem alle unterschiedlichen Genotypen der GPX-1 dargestellt sind. Die Unterscheidung der einzelnen Genotypen erfolgt anhand des unterschiedlichen Laufverhaltens der, die Trinukleotide beinhaltenden Fragmente.

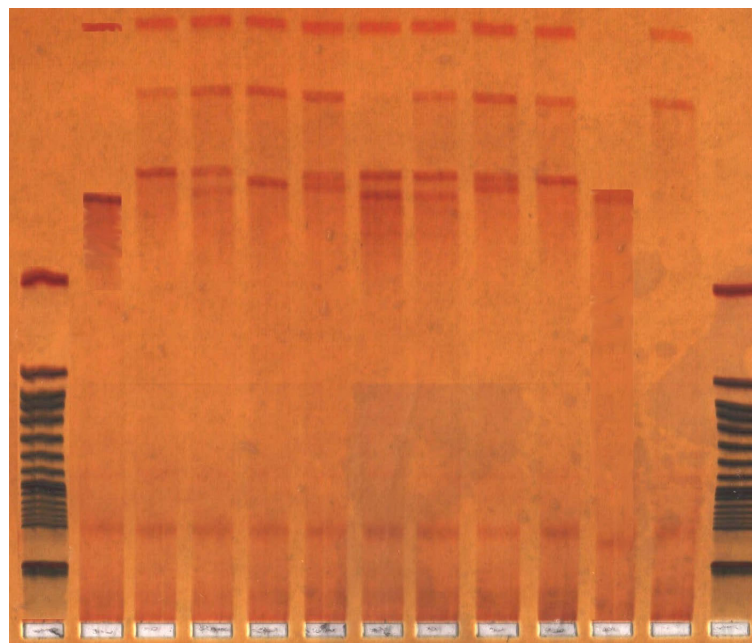


Abb. 12: RFLP aller GPX-Genotypen; aufgetragen auf $T_{15}C_4$ -Gel; Spur 1: 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2: Genotyp 6*6; Spur 3: Genotyp 4*4; Spur 4: Genotyp 4*6; Spur 5: Genotyp 5*5; Spur 6: Genotyp 4*5; Spur 7 und 8: Genotyp 4*6; Spur 9: Genotyp 4*5; Spur 10: Genotyp 4*4; Spur 11: Genotyp 5*6; Spur 13: 100 bp-DNA-Leiter

Nach dem Screening der Patientenproben wurde die absolute Allelzahl, die Allelfrequenz, die Genotypanzahl und die Genotypfrequenz jeweils nach PCR und nach RFLP ermittelt. Hierbei ergaben sich folgende Häufigkeiten, wobei die Bezeichnung „Erwartet“ die anhand der Allelfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz errechneten Genotypfrequenzen bezeichnet:

ALS-Patientenkollektiv (Genotypen)

GPX-Genotyp	beobachtet (N)	beobachtet (%)	erwartet (N)	erwartet (%)	chi
4/4	86	37,23%	80,07	34,66%	0,44
4/5	71	30,74%	70,06	30,33%	0,01
4/6	29	12,55%	41,80	18,10%	3,92
5/5	16	6,93%	15,33	6,63%	0,03
5/6	16	6,93%	18,29	7,92%	0,29
6/6	13	5,63%	5,46	2,36%	10,43
total	231	100,00%	231	100,00%	15,12

ALS-Patientenkollektiv (Allele)

GPX-Allel	beobachtet (N)	beobachtet (%)
4	272	58,78%
5	119	25,76%
6	71	15,37%
total	462	100,00%

p bei 5 Freiheitsgraden: 0,0099
 p bei 2 Freiheitsgraden: 0,0005

Abb. 13: Übersicht der gefundenen GPX-1-Genotypen und -Allele bei den untersuchten ALS-Patienten; der p-Wert gibt die Überprüfung der statistischen Signifikanz an

3.3.2 Kontrollgruppe

Nachdem die Allel-Häufigkeiten für die Patientenproben ermittelt waren, wurde die gleiche Versuchsreihe auf eine Kontrollgruppe angewendet, um die bisher gewonnenen Daten miteinander vergleichen zu können.

Nachfolgend sind – analog zu der Patientengruppe- die gewonnenen Daten der Kontrollgruppe aufgeführt.

Probandenkollektiv (Genotypen)

GPX-Genotyp	beobachtet (N)	beobachtet (%)	erwartet (N)	erwartet (%)	chi
4/4	50	36,23%	35,00	25,36%	6,43
4/5	25	18,12%	42,81	31,02%	7,41
4/6	14	10,14%	26,19	18,98%	5,67
5/5	18	13,04%	13,09	9,48%	1,84
5/6	24	17,39%	16,01	11,60%	3,98
6/6	7	5,07%	4,90	3,55%	0,90
total	138	100,00%	138	100,00%	26,23

Probandenkollektiv (Allele)

GPX-Allele	beobachtet (N)	beobachtet (%)
4	139	50,36%
5	85	30,80%
6	52	18,84%
total	276	100,00%

p bei 5 Freiheitsgraden: 0,0001

p bei 2 Freiheitsgraden: 0,0000

Abb. 14: Übersicht der gefundenen GPX-1-Genotypen und -Allele bei der untersuchten Kontrollgruppe, der p-Wert gibt die Überprüfung der statistischen Signifikanz an

3.3.3 Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen

Die nachfolgende Tabelle zeigt zum besseren Vergleich eine Zusammenfassung der Ergebnisse beider Kollektive. Anhand der statistischen Auswertung läßt sich erkennen, daß der p-Wert des Chi²-Testes –je nach Rundung- im Bereich der Signifikanz liegt.

beobachtet (Allele)	Patienten	Probanden	Summe
4	272	139	411
5	119	85	204
6	71	52	123
Total	462	276	738

erwartet (Allele)	Patienten	Probanden	Summe
4	257,3	153,7	411
5	127,7	76,3	204
6	77,00	46,00	123
Total	462	276	738

	beobachtet	erwartet	chi ²
Patienten	272	257,3	0,8407
	119	127,7	0,5937
	71,0	77,0	0,4675

	beobachtet	erwartet	chi ²
Probanden	139	153,7	1,4073
	85	76,3	0,9938
	52	46,0	0,7826

		1-digit-limit	2-digit-limit
Summe chi ²	5,0855		
p bei 1 Freiheitsgrad:	0,0241	<= 0,03	<= 0,025
p nach Sechsfeldertafel-Regel	1,0000	<= 1	<= 1

Abb. 15: Vergleich der Ergebnisse des ALS-Kollektiv mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe; der p-Wert des Chi²-Test befindet sich im Bereich der statistischen Signifikanzgrenze

Bei nachfolgendem Diagramm sind die Allelfrequenzen der Patienten- und Kontrollgruppe nach erfolgtem RFLP miteinander aufgetragen. Eine Aussage über die absoluten Häufigkeiten der Allele und der Genotypen war wegen der unterschiedlichen quantitativen Größe beider Gruppen nicht wissenschaftlich verwertbar.

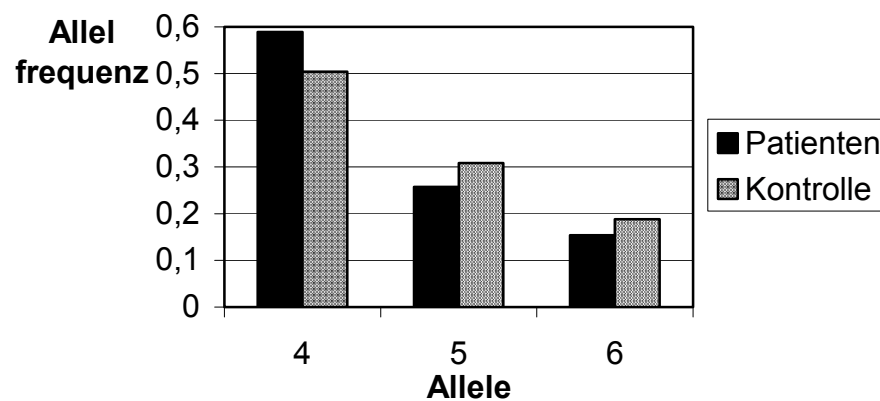


Abb. 16: Allelfrequenzen der GPX-1 von ALS-Patienten und Kontrollgruppe

In folgender Abbildung sind die Genotypfrequenzen der Patienten- und Kontrollgruppe zum besseren Vergleich graphisch gegeneinander aufgetragen.

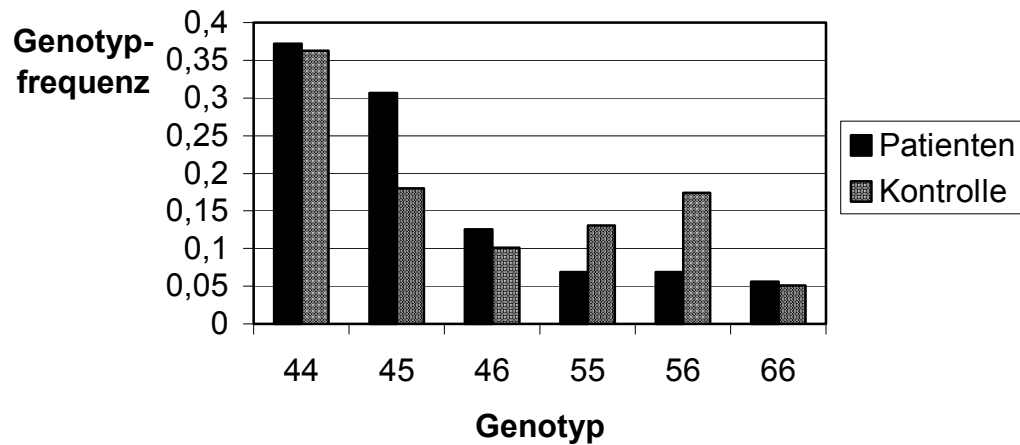


Abb. 17: Genotypfrequenzen der GPX-1 von ALS-Patienten und Kontrollgruppe

3.3.4 Vergleich der Kontrollgruppe mit Literaturdaten

Analog zu den vorherigen Darstellungen zeigt das nachstehende Diagramm den Vergleich der Allelfrequenzen der Kontrollgruppe mit den bisher veröffentlichten Literaturdaten.

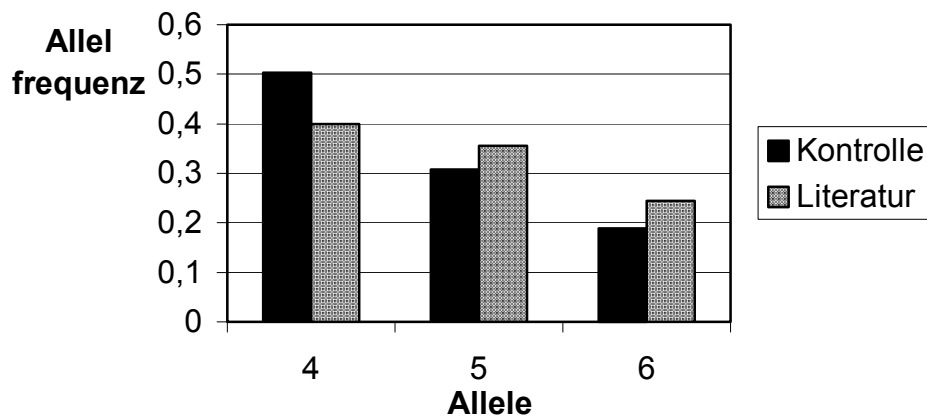


Abb. 18: GPX-1-Allelfrequenzen im Vergleich mit bisher veröffentlichten Literaturdaten

Der Vergleich zwischen den Häufigkeiten der Genotypen der Kontrollgruppe mit den Literaturdaten ergab folgendes Diagramm.

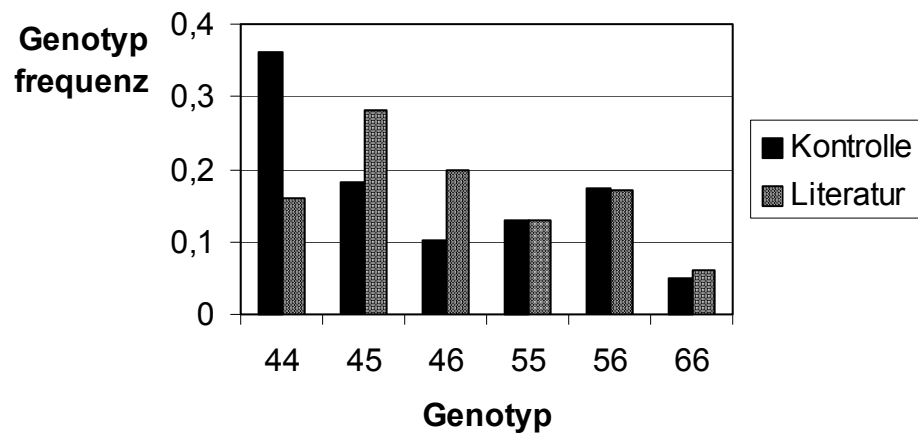


Abb. 19: GPX-1-Genotypen der Kontrollgruppe im Vergleich mit bisher veröffentlichten Literaturdaten

4 Diskussion

4.1 Methodenetablierung

Zu Beginn der Arbeit stand die Aufgabe der Etablierung einer reproduzierbaren, einfachen, günstigen und ungefährlichen Methode zur quantitativen Bestimmung der Trinukleotid-Repeats im 1. Exon der GPX-1 im Vordergrund. Dies wurde mittels der Methode der PCR mit anschließendem RFLP erreicht, wobei als erfolgreiche Primerkombination die Primer F1/R1 ausgemacht wurden. Die Schnittstelle des Primers F1 lag dabei 42 bp vor dem Beginn des 1. Exons, die Schnittstelle von R1 lag 36 bp hinter dem zu untersuchenden GCG-Repeat. Die Qualitätssicherung erfolgte durch Sequenzierung nach der Methode von Sanger et al..

Bei der PCR besteht das Risiko der Generierung von Sequenzveränderungen, was auf einer *in-vitro*-Fehlerrate der Taq-DNA-Polymerase beruht. Bevorzugt kommt es zum Austausch einzelner Basen (v.a. Cytosin zu Thymin), nur selten treten Deletionen oder Insertionen einer Base auf. Dabei gewinnt ein solcher Fehler der Taq-Polymerase besonders dann an Bedeutung, wenn er in den ersten Reaktionszyklen auftritt, denn das veränderte Reaktionsprodukt dient in den weiteren Zyklen als Vorlage für die Amplifizierung. Tritt ein solcher falscher Baseneinbau erst in späteren Zyklen auf, so wirkt sich dies nicht mehr so schwerwiegend auf das Gesamtprodukt aus, da nun die überwiegende Mehrheit der exakt amplifizierten PCR-Produkte der vorangegangenen Zyklen als Vorlage dient. Um solche Primerfehler zu vermeiden und die Ausbeute an spezifischen PCR-Produkten zu verbessern, wurde als Taq-Polymerase Amplitaq® GOLD von Perkin Elmer Applied Biosystems eingesetzt.

Die PCR unterliegt einer Vielzahl von Einflußmöglichkeiten, die sie sowohl hemmen als auch beschleunigen können. Zu häufigen Hemmstoffen gehören z.B. Heparin, das bei der Blutgewinnung zur Gerinnungsinhibition beigelegt wird oder andere im Blut enthaltene Substanzverbindungen, wie z.B. Porphyrinverbindungen. Deren Einfluß kann durch Lyse der Erythrozyten und anschließende Abzentrifugation der Leukozyten verringert werden. Die bei der Extraktion der DNA verwendete Proteinase K führt zur Zerstörung der DNA-Polymerase, so daß sie vor Durchführung der PCR entfernt oder zumindest denaturiert werden muß. Daneben gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten von Verunreinigungen der Proben, die ebenfalls Einfluß auf die Funktionstüchtigkeit der PCR haben können.

Da sich die durch PCR gewonnenen Ergebnisse trotz etlicher Versuche der Optimierung, sowohl der PCR als auch der nachfolgenden Gelelektrophorese, nicht ausreichend voneinander unterschieden, wurde im Anschluß an die PCR ein RFLP durchgeführt, bei dem sich schließlich der *double digest* mit den Restriktionsenzymen Hae II und Hae III als erfolgreich herausstellte. So konnten die einzelnen Genotypen voneinander unterschieden und deren Verteilung im Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe ermittelt werden.

Am Ende der Methodenetablierung ließ sich demnach folgendes feststellen:

1. Durch eine PCR mit den oben beschriebenen Primern F1/R1 läßt sich die Gensequenz mit dem gesuchten GCG-Repeat amplifizieren. Dieses Ergebnis wurde durch eine nachfolgende Sequenzierung, die als Qualitätskontrolle diente, bestätigt.
2. Die erhaltenen PCR-Produkte lassen sich mit Hilfe einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese trotz unterschiedlicher Elektrophoresebedingungen und Geleigenschaften nur durch die während der PCR entstehenden spezifischen Zusatzbanden voneinander unterscheiden.
3. Durch einen sich an die PCR anschließenden RFLP mit nachfolgender Polyacrylamidgel-Elektrophorese lassen sich die einzelnen Genotypen der GCG-Repeats voneinander unterscheiden.

Diese Methode unterscheidet sich von der durch Shen et al.⁸² veröffentlichten Methode in mehreren Punkten und weist einige Vorteile auf. Shen et al. ermittelten die betreffenden GCG-Repeats mittels PCR und anschließender Autoradiographie, bei der Radioisotope in die Sequenzierungsprimer eingebaut werden. Diese Methode erweist sich als sehr zeitintensiv, da für die Sequenzierung vier Reaktionen nötig – je eine für jeden der dNTP-Terminatoren.

Durch den hohen zeitlichen und materiellen Aufwand handelt es sich auch um eine sehr kostenintensive Methode, die somit nur schwerlich als Routinemethode Verwendung finden dürfte. Zusätzlich erschwerend dürfte hierbei die Tatsache sein, daß diese Methode durch die verwendeten Radioisotope und die damit verbundene energiereiche β -Strahlung eine erhöhte Gesundheitsgefährdung aufweist und verstärkte Schutzvorkehrungen nötig macht.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode hat somit gegenüber der bisherigen Methode nicht nur Vorteile durch eine Zeit- und Kostenersparnis, sie zeigt sich durch den Verzicht auf radioaktive Substanzen auch als weniger strahlenintensiv.

Nicht verschwiegen werden soll hierbei allerdings die Tatsache, daß in der hier verwendeten Methode die Benutzung von Gelen mit Polyacrylamid-Anteil ebenfalls einige Sicherheitsvorkehrungen – wie das Tragen von Mundschutz und Handschuhen und das Arbeiten unter dem Abzug- im Umgang mit gelösten Acrylamid nötig macht, da gelöstes Acrylamid eine karzinogene und neurotoxische Wirkung besitzt.

4.2 Pathogenetische Bedeutung freier Radikale

Der Einfluß von oxidativem Streß im allgemeinen und der Glutathion-Peroxidase im besonderen auf die Pathogenese vieler unterschiedlicher Erkrankungen ist durch zahlreiche Studien belegt worden, wobei die Anhäufung sog. reaktiver Sauerstoffprodukte hierbei eine große Rolle spielt. Eine kleine Menge solcher Produkte entsteht in allen Zellen bei einer Vielzahl von Vorgängen wie der Signalübertragung, der Aufrechterhaltung des Immunsystems und der Apoptose. Zur Beseitigung der reaktiven Sauerstoffprodukte stehen dem Körper eine Vielzahl von enzymalen Mechanismen – wie z.B. die Katalase, Superoxid-Dismutase und die Glutathion-Peroxidase - und nichtenzymalen Mechanismen – wie β -Carotin, Retinol, Ascorbinsäure und α -Tocopherol - zur Verfügung. Durch erhöhte Produktion oder verringerte Beseitigung solcher reaktiven Sauerstoffprodukte kommt es zu oxidativem Streß und damit zu einer Beeinflussung einer Vielzahl von Stoffwechselvorgängen. So können reaktive Sauerstoffprodukte sowohl direkt Veränderungen an Basenpaarungen bewirken als auch die Konformation der DNA verändern und damit zur Entstehung von Mutationen beitragen. Damit können sie auch die Effektivität der DNA-Reparatur und der DNA-Polymerasen verringern.

Die möglichen Schäden müssen sich jedoch nicht nur auf der Ebene der DNA bewegen, sondern können auch direkt die Proteine betreffen. So kann oxidativer Streß zur Aktivierung von Streßproteinen führen und die Lipidperoxidation fördern, wodurch es zur Aktivierung der Signalübertragung und der Zellproliferation und damit zu einem Einfluß auf das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und den Zelltod entweder durch Apoptose oder Nekrose kommen kann. Eine Übersicht über die vielfältigen Zusammenhänge der reaktiven Sauerstoffprodukte gibt nachstehende Graphik:

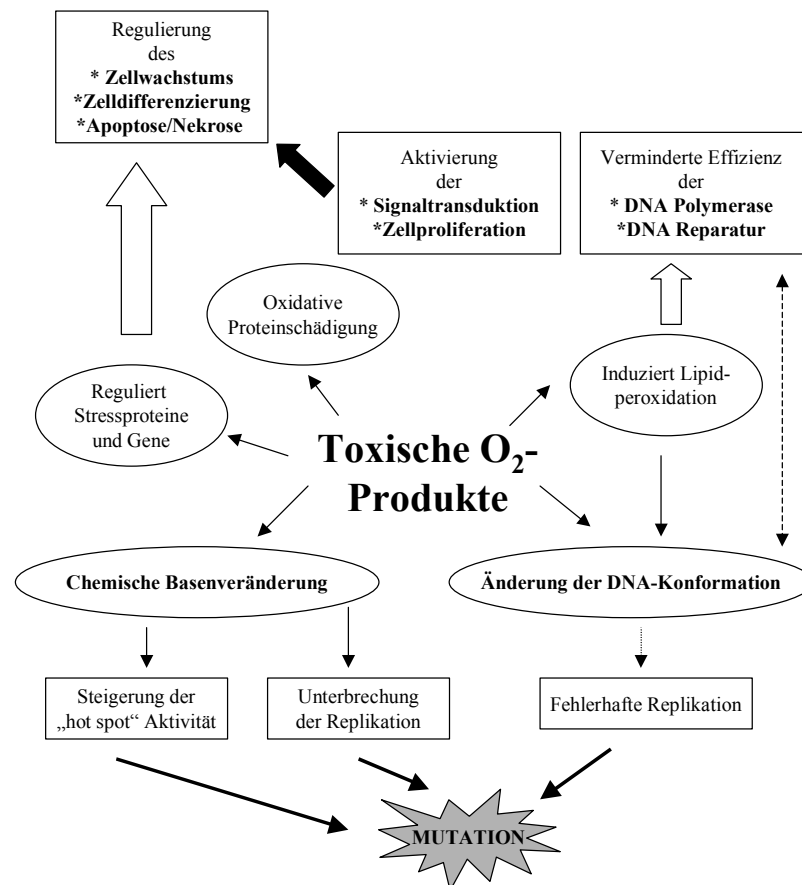


Abb. 20: Einfluß der reaktiven Sauerstoffprodukte auf zelluläre Funktionen (oben) und genetische Mutationen (unten); nach: J.M. Matés, F. Sanchés-Jimenéz: Antioxidant enzymes and their implications on pathophysiologic processes; Frontiers in Bioscience 4, d339-345, March 15, 1999

Die Glutathion-Peroxidase gehört zu den wichtigen Enzymen bei der Beseitigung toxischer Stoffwechselprodukte und schützt somit Zellen vor oxidativem Streß. Sie katalysiert die Reduktion einer Vielzahl von Hydroperoxiden, wobei Untersuchungen gezeigt haben, daß sie eine wichtige Funktion vor allem bei der Beseitigung niedriger Konzentrationen von toxischen Sauerstoffprodukten besitzt. Bei höheren Konzentrationen und somit größerer Gefahr für eine Zellschädigung scheint die ebenfalls zur Gruppe der Radikalfänger gehörende Katalase eine größere Rolle zu spielen⁸⁸.

4.3 Oxidativer Streß und Krankheiten

Eine Zusammenhang zwischen oxidativem Streß und verschiedenen Krankheiten ist nach den oben aufgeführten Einflüssen auf pathophysiologische Vorgänge wahrscheinlich und durch zahlreiche Studien bereits beschrieben worden. Die Breite an Krankheiten reicht hierbei von

pathophysiologischen Veränderungen - wie z.B. der Verringerung der Glutamatkonzentration während des Vorganges des Alterns⁶⁰-, über Allergien, benigne und maligne Tumorerkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen bis hin zu neurodegenerativen Erkrankungen. Alle Erkrankungen hier aufzuzählen, bei denen sich pathologische Veränderungen der Mechanismen zur Beseitigung reaktiver Sauerstoffprodukte nachweisen ließen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher soll hier nur kurz auf einige Zusammenhänge zwischen verschiedenen Erkrankungen und der GPX eingegangen werden.

So ist der Einfluß der SOD und GPX auf unterschiedlichste Varianten von Nahrungs- und Arzneimittelallergien beschrieben worden^{89,90,91,101}. Genauso spielt sie eine Rolle bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen^{92,93}, bei denen sich auch eine verminderte Aktivität der GPX-3 nachweisen ließ^{94,95}. Es ließ sich auch ein Zusammenhang zwischen *Helicobacter pylori* assoziierten Gastritiden herstellen⁹⁶ und man fand eine Erhöhung der SOD- und GPX-Aktivität bei intermittierender akuter Porphyrrie⁹⁷, bei benignen und malignen Mamma-Tumoren^{98,102} und bei einer Vielzahl an Funktionsstörungen der Schilddrüse, wie dem follikulären Adenom und dem papillären oder follikulären Karzinom⁹⁹. Auch etliche Erkrankungen des glomerulären Apparates der Niere stehen in Zusammenhang mit oxidativem Streß¹⁰⁰.

Nicht zuletzt konnte auch bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Alzheimer¹⁰³, M. Huntington¹⁰⁴ und M. Parkinson¹⁰⁵ ein Zusammenhang zwischen der Pathophysiologie und GPX bzw. SOD hergestellt werden.

4.4 Trinukleotid-Expansion und Krankheiten

Nach der Entdeckung von Trinukleotid-Repeats im Genom wurden diese zunächst für Normvarianten ohne Einfluß auf Struktur und Funktion der DNA gehalten. Dies änderte sich jedoch, als man herausfand, daß solche Trinukleotid-Repeats expandieren können und so zur Entstehung von verschiedenen Krankheiten beitragen können. Trotz der unterschiedlichen Krankheiten, die sie hervorrufen können, haben sich einige Gemeinsamkeiten der Repeats herausgestellt.

Zunächst verhält sich ein mutierter Repeat sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen instabil und er neigt in nachfolgenden Replikationen eher zu Expansionen als zu Verkürzungen. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß sich ein kurzer Repeat noch relativ stabil verhält und nur zu geringen Expansionen neigt, er aber ab einer bestimmten Länge instabil wird, wobei dieser

Expansionsschwellenwert nicht automatisch für die Manifestation der Erkrankung erforderlich ist¹¹³. Außerdem korreliert eine zunehmende Länge des Repeats mit einem früheren Krankheitsbeginn und einer schwereren Krankheitsausprägung. Man entdeckte auch die Tendenz, daß die Repeats, die mit einem Funktionsverlust (*loss of function*) des kodierten Proteins einhergehen, länger sind als diejenigen Repeats, die mit einem zusätzlichen Funktionsgewinn (*gain of function*) einhergehen. Als Beispiel gilt hier die Expansion des CGG-Repeats bei dem fragilen X-Syndrom auf über 1000 Repeats mit nachfolgendem Funktionsverlust, wohingegen der CAG-Repeat bei spinocerebellärer Ataxie Typ I nur auf 40-81 Repeats expandiert. Hieraus resultiert ein pathologischer Funktionsgewinn¹¹³.

Erkrankungen, an deren Pathophysiologie Trinukleotid-Repeats beteiligt sind, können in zwei Untergruppen eingeteilt werden: zunächst die Gruppe, deren Repeat sich im nicht-kodierenden Intron der DNA befindet und die Gruppe, deren Repeat sich im kodierenden Exon befindet.

4.4.1 Krankheiten mit nicht-kodierenden Trinukleotid-Repeats

Die Trinukleotid-Repeats dieser Krankheiten sind charakterisiert durch lange und variable Expansionen. Abgesehen von dieser Gemeinsamkeit unterscheiden sich die Repeats in ihrer Sequenz und in ihrer Lokalisation im jeweiligen Gen, was offensichtlich einen entscheidenden Einfluß auf die unterschiedliche Pathogenese der von ihnen hervorgerufenen Erkrankungen zu haben scheint.

So scheint die Expansion eines CGG-Repeats auf mehr als 230 Triplets beim fragilen-X-Syndrom zu einer Hypermethylierung im Bereich der Promoter-Region des für die geistige Retardierung verantwortlichen Gens zu führen, wodurch es zu einer verminderten Transkription und damit zu einer verringerten Ausbeute des Genproduktes kommt.

Bei der Friedreich-Ataxie scheint der lange GAA-Repeat Interferenzen während der Transkription zu verursachen, indem er die DNA in einer Triplex-Struktur stabilisiert.

Die Expansion eines CTG-Repeats im Intron des Gens für eine Protein-Kinase bei myotoner Dystrophie könnte deren Transkription und/oder Translation oder auch die Expression benachbarter Gene beeinflussen. Ähnlich verhält es sich bei der CTG-Repeat-Expansion bei spinocerebellärer Ataxie Typ VIII oder der CAG-Expansion bei Typ XII¹⁰⁶.

4.4.2 Krankheiten mit kodierenden Trinukleotid-Repeats

Bei diesen Erkrankungen befinden sich die Expansionen der Trinukleotid-Repeats im Exon und sind deutlich kürzer als die nicht-kodierenden Trinukleotid-Expansionen. Alle Erkrankungen sind durch progressive neuronale Dysfunktion geprägt, die typischerweise im mittleren Lebensalter beginnt und in einer schweren Neurodegeneration endet. Man vermutet als pathogenetische Ursache eine Destabilisierung der ursprünglichen Proteinkonformation und eine Bildung von Proteinaggregaten, die sich beispielsweise bei M. Huntington als Kerneinschlüsse im Neuropil nachweisen lassen oder mit anderen Proteinen, wie z.B. Caspasen, in Interaktion treten können¹⁰⁷.

So ließ sich beim Kennedy-Syndrom (= spinale und bulbäre Muskelatrophie) eine CAG-Repeat-Expansion im 1. Exon des Androgen-Rezeptor-Gens ermitteln, wobei die Anzahl der Repeats von 11-33 bei Gesunden auf 38-62 bei Erkrankten anstieg¹⁰⁸. Auch bei M. Huntington, spinozerebellärer Ataxie Typ I, II, VI und VII und der dentatorubralen pallidolusyanen Atrophie ließ sich eine CAG-Expansion in unterschiedlichen Genen ausmachen^{109,110}.

Eine GCG-Expansion in einem Exon, wie sie auch in dieser Arbeit vorliegt und die in Polyalanin-Ketten übersetzt wird, fand sich bisher bei der Synpolydaktilie, der cleido-cranialen Dysplasie und der oculo-pharyngealen muskulären Dystrophie¹¹³.

4.5 Schädigungsmechanismen der Trinukleotid-Expansionen

Wie können solche Trinukleotid-Expansionen nun Einfluß auf die Pathogenese dieser unterschiedlichen Erkrankungen nehmen? Hierzu gibt es bis heute einige theoretische Ansätze, wobei sich herauszustellen scheint, daß die Mechanismen verschieden sind. Dafür spricht die Tatsache, daß sich Trinukleotid-Expansionen sowohl an 5'- und 3'-Enden der DNA (sog. UTR's = untranslated regions) finden lassen, die nicht übersetzt werden, als auch in kodierenden Exons¹¹⁰.

Eine Theorie zur Entstehung der Trinukleotid-Expansionen ist die Verschiebung der Insertionsstellen der DNA-Polymerase. Hierbei folgt der vorübergehenden Trennung der beiden DNA-Stränge eine fehlerhafte Wiederverknüpfung der Stränge während der Replikation der DNA mit der Bildung einer kleinen Schlinge (*loop*). Wenn diese Schlinge nicht durch Exo-, Endonukleasen und DNA-Polymerasen repariert wird, kommt es entweder zu einer Verlängerung (wenn sie in dem Strang entsteht, der verlängert wird), oder zu einer Verkürzung

der DNA (wenn sich die Schlinge in dem Strang befindet, der als Muster zur Replikation zur Verfügung steht)¹¹⁴.

In einer anderen Theorie treten die Expansionen während der Bildung der sog. Okazaki-Fragmente auf mit der Folge einer fehlerhaften DNA-Verschiebung. Okazaki-Fragmente entstehen während der Replikation am DNA-Folgestrang, der hierbei mit Hilfe von RNA-Primern an verschiedenen Stellen gleichzeitig synthetisiert wird. Die einzelnen Replikationsfragmente bezeichnet man als Okazaki-Fragmente. Obwohl eine solche Verschiebung einen Angriffsort für Endonukleasen mit dem Ziel der Reparatur darstellen würde, könnte die DNA durch die Bildung einer sog. Haarnadel (*hairpin*) resistent gegenüber Endonukleasen sein.

Nachfolgende Graphik soll die Entstehungsmechanismen von Trinukleotid-Expansionen verdeutlichen:

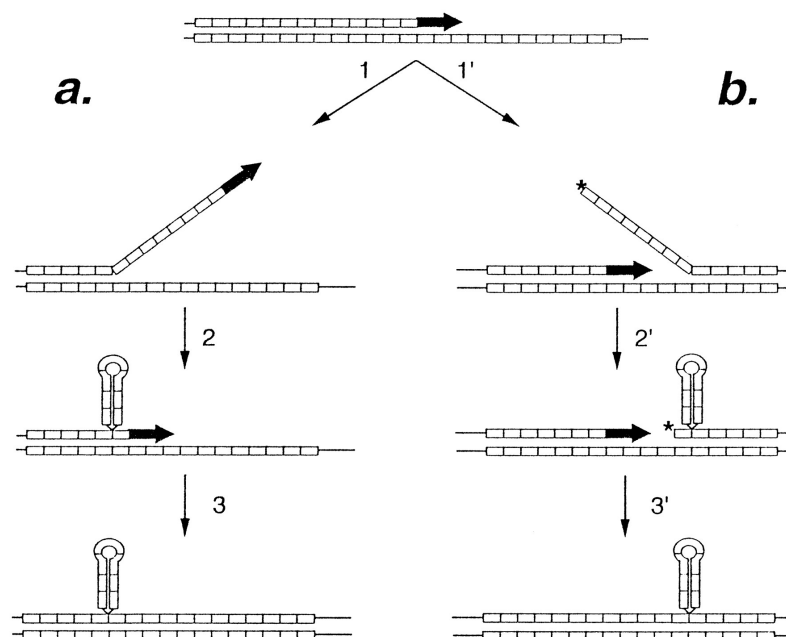


Abb. 21: Zwei Modelle zur Entstehung von Trinukleotid-Expansionen; **(a)** Expansion als Folge einer Verschiebung der DNA-Polymerase: (1) Die DNA-Stränge dissoziieren während der Replikation (2) Während der Wiederanlagerung entsteht ein hairpin im Tochterstrang (3) Wenn der loop nicht repariert wird, kommt es zur Expansion; **(b)** Expansion als Folge einer Verschiebung des Okazaki-Fragmentes: (1') Synthese verschiebt sich am 5'-Ende des benachbarten Okazaki-Fragmentes (2') Der entfernte Strang klappt aufeinander und bildet ein hairpin (3') Während der Synthese und Ligation der Stränge kommt es zur Trinukleotid-Expansion

Nach: Proc Natl Acad Sci USA Vol. 96, Issue 4, 1504-1509, February 16, 1999

Die Entstehung solcher *loops* oder *hairpins* könnte nicht nur zu einer erhöhten Instabilität des Repeats beitragen, sie könnte auch Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur der DNA bewirken¹¹⁰, also die räumliche Struktur der DNA beeinflussen, und damit neue Interaktionen mit anderen Proteinen ermöglichen. So zeigten lineare DNA-Sequenzen mit Trinukleotid-Expansionen ein anormales Laufverhalten während der Polyacrylamidgel-Elektrophorese, was auf neue bzw. veränderte biophysikalische Eigenschaften zurückgeführt werden könnte¹¹⁵. CTG-Repeats lassen sich z.B. leichter in Nukleosomen organisieren als DNA mit Mischsequenzen, CGG-Repeats lassen sich dagegen nur schlecht in Nukleosomen integrieren, was u.a. an ihrer veränderten Flexibilität zu liegen scheint und für die Regulation der Genexpression und Transkription von wichtiger Bedeutung ist¹¹⁷.

Chastain et al. zeigten, daß selbst kurze Trinukleotid-Sequenzen eine große Fähigkeit besitzen, die Rotationsfähigkeit der DNA deutlich zu erhöhen¹¹⁶. Hinsichtlich der Flexibilität hat sich gezeigt, daß der GCG-Repeat im Vergleich zu anderen Repeats am flexibelsten ist und somit am ehesten zur Deformierung der Sekundärstruktur führen kann¹¹⁰. Dies wiederum hat einen direkten Einfluß auf die Aktivität der DNase I, die wesentlich eher an geknickter als an linearer DNA bindet und schneidet¹¹⁸.

So fanden Moore et al. heraus, daß DNA-loops mit CNG (N steht hierbei für eine beliebige Purin- oder Pyrimidinbase) während der Meiose nur sehr unzureichend repariert werden, AGT/ACT-Repeats durchschnittlich und AAG/CTT- sowie CAA/TTG-Repeats sofort repariert werden. Sie folgerten hieraus, daß CTG, CAG, CCG oder CGG, aber nicht AAG oder CTT in der Lage sind, *in vivo hairpins* zu bilden¹¹⁴, wobei sie die Eigenschaften der Basenpaarung und nicht so sehr die eigentliche DNA-Sequenz für die Ineffizienz der DNA-Reparatur verantwortlich machten.

So könnte die Expansion von Trinukleotid-Repeats auf unterschiedliche Weise auf die Sekundärstruktur der DNA einwirken. Zum Einen könnten *hairpin*-Strukturen der DNA eine Verschiebung der DNA-Polymerase bewirken, was die Bildung von DNA-*loops* und damit die zusätzliche Instabilität zur Folge hätte.

Zum Zweiten könnten *hairpins* auch resistenter gegenüber Endonukleasen sein und damit zur weiteren Expansion beitragen. Zuletzt könnte die Änderung der DNA-Sekundärstruktur zu einer verringerten Aktivität der DNA-Polymerase führen, was wiederum die Wahrscheinlichkeit von Basenverschiebungen oder Rekombinationen erhöhen würde.

Weitere Unterschiede der Repeats gibt es hinsichtlich ihrer sog. hotspot-Aktivität. Hierunter versteht man ihre Fähigkeit, während der Meiose DNA-Rekombinationen zu ermöglichen. Solche hotspots finden sich in der DNA häufig an Sequenzwiederholungen, also an einzelnen

Nukleotidketten, Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Repeats, die eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Spontanmutationen aufweisen¹¹⁵.

4.6 Interpretation

Die durch diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse bedürfen einer ausführlichen Interpretation, um sie in den Zusammenhang mit bereits erworbenen Erkenntnissen zu setzen und neue Forschungsansätze zu formulieren, wobei die Ausführungen zur Etablierung der Methode bereits in Kapitel 4.1 dargelegt wurden.

In Anlehnung an Kapitel 3.3.3 sollen zunächst die gewonnenen Patientendaten in Bezug auf die Kontrollgruppe analysiert werden. Hierbei zeigt sich hinsichtlich der Allelfrequenz ein – statistisch gesehen – nur grenzwertig signifikanter Unterschied, die Genotypfrequenzen unterscheiden sich jedoch deutlich: In der Patientengruppe ist der Genotyp 4*5 signifikant häufiger vertreten als in der Kontrollgruppe, in der dagegen der Genotyp 5*6 deutlich häufiger vertreten ist. Da in beiden Gruppen nach der identischen Methode vorgegangen wurde, kann die Ursache dieser Differenzen nicht an der Methodik liegen. Neben der Möglichkeit, daß der Genotyp 4*5 mit einem erhöhten sALS-Erkrankungsrisiko behaftet ist, könnten diese Unterschiede auch andere Ursachen haben.

Eine Möglichkeit liegt im Altersunterschied der beiden Gruppen. Der Altersdurchschnitt der Patientengruppe war nicht bekannt, ist jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach in mittleren bis höheren Altersabschnitten anzusiedeln, da es sich bei ALS um eine Erkrankung des mittleren und höheren Lebensalters handelt. Der Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe ist ebenfalls nicht bekannt, da es sich jedoch um eine randomisierte Auswahl an Medizinstudenten handelt, ist zu erwarten, daß sich der Altersunterschied deutlich unterhalb dem der Patientengruppe befinden dürfte. Die Gefahr, daß sich in dieser Gruppe potentielle Patienten mit genetischer Prädisposition befinden dürften, bei denen aufgrund ihres niedrigen Lebensalters die ALS klinisch noch nicht manifest geworden ist und die so zu einer Verfälschung der Ergebnisse beitragen würden, dürfte bei einer ALS-Inzidenz von ca. 1 zu 100000 als gering betrachtet werden und so die unterschiedlichen Ergebnisse nicht ausreichend erklären.

Ähnlich verhält sich die Problematik durch eventuelle Rassenunterschiede. Sowohl bei der Patienten- als auch bei der Kontrollgruppe dürfte es sich um einen Querschnitt der deutschen

Bevölkerung gehandelt haben, wobei Unterschiede der Genotypen auch hierin begründet sein könnten.

Forsberg et al.¹¹⁹ beschrieben kürzlich einen weiteren Polymorphismus im Gen der GPX-1. Sie beschrieben eine Prolin/Leucin-Variante an Position 197, die durch einen C/T-Austausch an Position 3428 des GPX-1-Gens zustande kommt. Trotz des Polymorphismus fanden sie keine veränderte GPX-Aktivität bei 315 Individuen und keine Häufung des Polymorphismus bei 101 Patienten mit cerebralem Insult. Die Verteilung des Polymorphismus unterschied sich jedoch im Vergleich von finnischer mit schwedischer Bevölkerung. Ferner stellten sie folgenden Zusammenhang zwischen dem gefundenen Polymorphismus und den hier untersuchten Trinukleotid-Repeats fest: Das Allel, das für Leucin kodiert, tritt zusammen mit 5 GCG-Repeats auf, wohingegen das Allel, das für Prolin kodiert, mit dem Auftreten von 4 und 6 GCG-Repeats korreliert.

Somit könnten die unterschiedlichen Genotypfrequenzen in vorliegender Arbeit auch auf eine unterschiedliche Verteilung des durch Forsberg et al. beschriebenen Polymorphismus zurückzuführen sein. Hierzu wäre es von Interesse, die Verteilung dieses Polymorphismus sowohl in einem Querschnitt der deutschen Bevölkerung zu bestimmen, da sich hinsichtlich dessen Verteilung bereits signifikante Unterschiede zwischen schwedischer und finnischer Bevölkerung ergeben haben, als auch dessen Verteilung bei den vorliegenden Proben der ALS-Patienten zu bestimmen. Dazu müßten die vorliegenden Proben mittels single-stranded-conformational-polymorphism-Elektrophorese (SSCP) untersucht werden, womit sich einzelne Punktmutationen mit geringem Aufwand detektieren lassen. Hiernach würden sich folgende Rückschlüsse ziehen lassen:

1. Wie verteilt sich der Prolin/Leucin-Polymorphismus im Querschnitt der deutschen Bevölkerung ?
2. Wie verteilt sich der Prolin/Leucin-Polymorphismus bei ALS-Patienten und ist bei dieser Verteilung ein Unterschied zwischen ALS-Patienten und Kontrollgruppe festzustellen?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem gefundenen Polymorphismus und der Verteilung der GCG-Repeats bei ALS-Patienten und in der Kontrollgruppe?

In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, das GPX-1-Gen mittels oben erwähnter SSCP bzw. Sequenzierung auf weitere Polymorphismen hin zu untersuchen. Im Anschluß hieran müßte

erforscht werden, ob sich auch bei etwaigen weiteren Polymorphismen ein Zusammenhang mit der Verteilung der GCG-Repeats bestimmen läßt.

Beim Vergleich der Verteilung der GCG-Repeats zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der durch Shen et al. beschriebenen Verteilung der GCG-Repeats in zufällig ausgewählten Proben ergab sich folgendes Ergebnis: wie in Kapitel 3.3.5 graphisch dargestellt, ließ sich kein signifikanter Unterschied der in der Literatur beschriebenen Verteilung des GCG-Repeats im Vergleich zu der hier verwendeten gesunden Kontrollgruppe darstellen, allerdings war bei der verwendeten Kontrolle der Genotyp 4*4 signifikant häufiger vertreten, wohingegen in der Literatur die Genotypen 4*5 und 4*6 häufiger beschrieben wurden. Worin könnten die Ursachen dieser unterschiedlichen Verteilung liegen?

Zunächst kann man hier methodische Aspekte in Erwägung ziehen. Shen et al. entdeckten damals die Expansion des GCG-Repeats mittels PCR, die allerdings mit Hilfe unterschiedlicher Primer durchgeführt wurde, und anschließender Autoradiographie. Sie ermittelten die Allelhäufigkeit nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz, wodurch sich die unterschiedlichen Ergebnisse erklären ließen. Sie errechneten also die einzelnen Genotyp-Häufigkeiten anhand der wahrscheinlichen Verteilung der Allel-Häufigkeiten, ohne jede einzelne Probe nach der Häufigkeit der Repeats zu untersuchen. Ein Grund für diese Vorgehensweise mag darin liegen, daß ihr Kollektiv lediglich aus 55 zufällig ausgewählten DNA-Proben bestand.

Ein weiterer Unterschied könnte in der Auswahl des untersuchten Kollektivs zu finden sein. In der Studie von Shen et al. wird nicht erwähnt, welchen Altersdurchschnitt das ausgewählte Kollektiv hatte. Genauso wenig wird die ethnische Herkunft des Kollektivs berücksichtigt, also aus welchen Bevölkerungsgruppen es sich rekrutierte. Da die Studie in Massachusetts durchgeführt wurde, ist jedoch davon auszugehen, daß es sich nicht um einen Querschnitt der deutschen Bevölkerung handelt wie in vorliegender Arbeit. Die unterschiedliche ethnische Verteilung des durch Forsberg entdeckten Prolin/Leucin-Polymorphismus mit dem oben beschriebenen Zusammenhang des GCG-Repeats würde Vermutungen auf eine unterschiedliche ethnische Verteilung des GCG-Repeats zulassen. Anlaß für solche Vermutungen würde auch die Entdeckung geben, daß afro-amerikanische Kinder eine höhere Aktivität der GPX-1 aufweisen als kaukasische Kinder¹²⁰. Bei einem elektrophoretisch durch Beutler et al.¹²¹ nachgewiesenen Polymorphismus der GPX-1 wurden durch Meera Khan et al. unterschiedliche Verteilungen

zwischen afro-jamaikanischen, indischen und holländischen Populationen gefunden¹²². Diese Ergebnisse stützen die Vermutung einer unterschiedlichen ethnischen Verteilung des GCG-Repeats, was die Differenzen zu den Ergebnissen der Shen-Studie erklären könnte. Dies würde jedoch eine weitere Abklärung nötig machen. Ein Ansatz wäre, in zukünftigen Studien die ethnische Verteilung des GCG-Repeats zu bestimmen und einen eventuellen Zusammenhang mit dem durch Forsberg et al. ermittelten Polymorphismus herzustellen, genauso wie die ethnische Verteilung eventuell noch zu entdeckender GPX-1-Polymorphismen zu klären.

Shen et al. konnten in ihrer Studie keine Unterschiede der GPX-1-Aktivität trotz unterschiedlicher GCG-Repeats feststellen, wobei sie die Aktivität spektrophotometrisch bestimmten. Die verwirrenden und zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zur GPX-Aktivität, die bereits in Kapitel 1.6.4.7 ausführlich dargestellt wurden, geben jedoch Anlaß, das Ergebnis von Shen et al. zu hinterfragen. Wodurch lassen sich so unterschiedliche Befunde erklären und welche Rückschlüsse für zukünftige Studien lassen sich hieraus ziehen?

Die Aktivität eines Enzyms stellt stets eine Mischung aus alleiniger spezifischer Enzymaktivität und der entsprechenden Expressionsrate des dazugehörigen Gens dar. Um daher zu einem aussagekräftigen Ergebnis der Enzymaktivität zu kommen, müßte bei jeder durchgeführten Aktivitätsbestimmung gleichzeitig auch die genaue Molekülmenge erfasst werden, was z.B. mit Hilfe eines Immunoassays mittels spezifischer Antikörper bzw. der quantitativen Bestimmung der mRNA möglich wäre. So könnte eine Änderung der Enzymaktivität aufgrund einer veränderten spezifischen Aktivität von derjenigen abgegrenzt werden, die aufgrund einer veränderten Expressionsrate zustande kommt. Obwohl dies zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen würde, wurde dieser Tatsache von den meisten Autoren nicht Rechnung getragen.

So läßt sich im nachhinein nicht nachvollziehen, ob die durch Shen et al. gemessene unveränderte Enzymaktivität wirklich ihre Ursache in einer Unabhängigkeit von der Expansion der GCG-Repeats findet, oder ob sie durch eine Veränderung des Verhältnisses der spezifischen Aktivität zur Expressionsrate zustande gekommen ist. Ähnlich verhält es sich in der Studie von Forsberg et al., die trotz des Prolin/Leucin-Polymorphismus keine veränderte Enzymaktivität ermittelten, hierbei aber ebenfalls nicht den Einfluß der Genexpression berücksichtigten.

Die oben beschriebenen unterschiedlichen Einflüsse von Trinukleotid-Repeats auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der DNA können zu deutlichen Veränderungen der Expression des jeweiligen Gens führen. So kann durch solche Expansionen die Integrationsfähigkeit der DNA in

Nukleosomen und Histonen beeinflusst werden. Dies führt zu einer Veränderung der Genaktivität, da die Transkription nur in histonfreien DNA-Abschnitten erfolgen kann.

Durch die Veränderung der dreidimensionalen DNA-Struktur kann auch die Bindungsfähigkeit verschiedener Replikations- und Translationsenzyme beeinflusst werden und so eine Veränderung der Genexpression bewirken.

Nicht zuletzt kann durch die Entstehung von *loops* oder *hairpins* die räumliche Struktur der DNA in einem solchen Maße beeinflusst werden, daß es zu neuen Interaktionen mit anderen Proteinen kommt. Diese Proteine können wiederum zu einer Veränderung der Genexpression als auch zu einer Veränderung der Enzymaktivität führen.

Die Enzymaktivität kann jedoch nicht nur durch die oben beschriebenen Faktoren der Genexpression und die Interaktion mit Proteinen, die als Aktivatoren oder Inhibitoren wirken können, verändert werden, sondern unterliegt auch noch anderen Einflüssen.

Die Substrate der GPX können - neben den oben beschriebenen Wechselwirkungen mit der DNA - genauso wie die Produkte Einfluß auf die Aktivität der GPX nehmen.

So kann es durch einen Überschuß von Hydroperoxiden zu einer sog. Substrathemmung der GPX kommen. Hierbei kommt es durch an Überangebot von Substrat zur Bildung von sog. Enzym-Substrat-Substrat-Komplexen, die das aktive Zentrum des Enzyms blockieren können und so zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms führen können.

Genauso kann das Produkt der katalysierten Reaktion auf unterschiedliche Weise die Enzymaktivität hemmen (neg. Rückkopplung), ein Mechanismus, der im Organismus vorzugsweise der Selbstregulation von Enzymen dient.

Diese Tatsachen machen folgende zukünftige Vorgehensweise zum Erhalt aussagekräftiger Ergebnisse erforderlich:

1. Die Messung der Enzymaktivität sollte immer zusammen mit einer Messung der Genexpression erfolgen.
2. Die Messung der Enzymaktivität sollte immer zusammen mit einer Konzentrationsmessung der Substrate und Produkte der katalysierten Reaktion erfolgen.

In diesem Kontext sollten auch die Ergebnisse von Przedborski et al. gesehen werden, die in den von ALS betroffenen Hirnregionen verstorbener ALS-Patienten eine signifikante

Aktivitätsminderung der GPX feststellten⁶⁶, aber ebenfalls die obengenannten Einflußmöglichkeiten nicht berücksichtigten.

4.7 Ausblick

Die bisherigen Erkenntnisse zur Pathogenese der ALS machen eine Mitbeteiligung von oxidativem Streß an ihrer Entstehung wahrscheinlich. Dies kann seine Ursache in genetischen Veränderungen der, an der Beseitigung reaktiver Sauerstoffprodukte beteiligten Substanzen haben, kann jedoch auch durch eine vermehrte Produktion solcher Produkte bedingt sein. Genauso können andere – oben beschriebene - Faktoren Einfluß auf die Fähigkeit des Organismus nehmen, solche reaktiven Sauerstoffprodukte rechtzeitig und in ausreichendem Maße zu beseitigen.

Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit und den oben beschriebenen multiplen Wechselwirkungen des komplizierten Systems der Entgiftung reaktiver Sauerstoffprodukte ergeben sich für weitere Studien vielfältige Ansatzpunkte, die die Untersuchung weiterer Kandidatengene und die Etablierung von Risikoprofilen zur Folge haben und so hoffentlich die Erkenntnisse zur Pathogenese der ALS vermehren

Ich halte folgende Ansätze für sinnvoll:

1. Ermittlung der Verteilung des Prolin/Leucin-Polymorphismus der GPX-1 bei den untersuchten ALS-Patienten und der Kontrollgruppe. Danach kann überprüft werden, ob die beschriebene Korrelation zwischen diesem Polymorphismus und den GCG-Repeat-Expansionen auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben reproduzierbar ist.
2. Ermittlung der GPX-Aktivität bei vorliegenden ALS-Proben zusammen mit der Ermittlung der Genexpression und der Konzentrationsmessung reaktiver Sauerstoffprodukte, um aussagefähige Ergebnisse über die spezifische GPX-Aktivität, die Genexpression und die Konzentration reaktiver Sauerstoffprodukte in Zusammenhang mit der Trinukleotid-Expansion zu erhalten.
3. Mutationsscreening im GPX-1-Gen, um weitere Mutationen und deren Einfluß auf die Trinukleotid-Expansion bzw. GPX-Aktivität zu eruieren.

5 Zusammenfassung

Trotz intensiver Erforschung der Ätiopathogenese der sporadischen amyotrophen Lateralsklerose (sALS) ist deren Entstehungsursache weiterhin unbekannt. Es gibt jedoch verschiedene Hinweise darauf, daß an der Entstehung der sALS und anderer neurodegenerativer Erkrankungen die Beteiligung von oxidativem Streß eine Rolle spielt⁸⁸. Erneuten Aufschwung erhielt dieser Theorieansatz im Jahre 1996, als Przedborski et al. die Aktivitäten der als Radikalfänger fungierenden Enzyme Glutathion-Peroxidase (GPX), Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase in den Gyrus praecentrales und der Kleinhirnrinde von verstorbenen sALS-Patienten bestimmten. Sie fanden dabei eine verminderte GPX-Aktivität in den Gyrus praecentrales bei sALS-Patienten, nicht aber in deren Kleinhirnrinde oder in der Kontrollgruppe⁶⁶. Aus diesen Ergebnissen schlossen sie auf eine Mitbeteiligung der GPX an der Ätiopathogenese der sALS.

Unabhängig hiervon wurden kurz zuvor die Ergebnisse von Shen et al. veröffentlicht⁸². Sie fanden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Autoradiographie bei 55 zufällig ausgewählten DNA-Proben eine GCG-Trinukleotid-Expansion im 1. Exon des für die zelluläre GPX (GPX-1) kodierenden Gens und ermittelten die Genotyp-Häufigkeiten nach deren Verteilungswahrscheinlichkeit (Hardy-Weinberg-Gesetz). Trinukleotid-Expansionen unterschiedlicher Länge und unterschiedlicher Lage im Genom (sowohl kodierend als auch nicht-kodierend) konnten bis heute bei 14 unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen¹⁰⁶ und auch zahlreichen anderen Krankheiten¹⁰⁷ nachgewiesen werden. So war das Ziel dieser Arbeit, eine fragliche Mitbeteiligung der Trinukleotid-Expansion der GPX-1 an der Pathogenese der sALS zu klären.

In dieser Arbeit wurde eine reproduzierbare und kostengünstige Methode zur Bestimmung dieser Trinukleotid-Expansion etabliert und anschließend deren Verteilung bei einer Auswahl von 231 sALS-Patienten ermittelt und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die Daten der Kontrollgruppe ließen sich bezüglich ihrer Allel- und Genotypfrequenz auch mit den bisher veröffentlichten Literaturdaten vergleichen.

Hinsichtlich der Methodenetablierung erwies sich folgendes Verfahren als erfolgreich:

Nach der Amplifikation des den GCG-Repeat beinhaltenden Genabschnitts mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde das PCR-Produkt mittels der Methode des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) in kleinere Fragmente gespalten und durch anschließende Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. So konnten die einzelnen

Allele und Genotypen voneinander unterschieden werden und deren Verteilung in der Patienten- und Kontrollgruppe ermittelt werden. Zur Qualitätssicherung wurde eine Sequenzierung durchgeführt.

Obwohl die Signifikanz der Unterschiede zwischen sALS-Patienten und Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer Allelfrequenz statistisch grenzwertig war, zeigte sich, daß der Genotyp 4*5 bei sALS-Patienten signifikant häufiger zu finden war, wohingegen der Genotyp 5*6 in der Kontrollgruppe signifikant überrepräsentiert war. Neben der Möglichkeit, daß der Genotyp 4*5 mit einem erhöhten Risiko behaftet ist, an sALS zu erkranken, könnten die Unterschiede auch andere Ursachen haben. So könnte ein Zusammenhang mit einem kürzlich von Forsberg et al.¹¹⁹ beschriebenen C/T-Polymorphismus der GPX-1, der zu einem Austausch von Prolin zu Leucin führt, bestehen. Forsberg et al. fanden bei ihren Proben heraus, daß die für Leucin kodierende Variante nur zusammen mit 5 GCG-Repeats auftritt, die für Prolin kodierende Variante mit dem Auftreten von 4 und 6 GCG-Repeats korreliert. Daher wäre es für zukünftige Studien von Interesse, die Verteilung dieses Polymorphismus bei den hier verwendeten sALS-Proben zu ermitteln und zu überprüfen, ob sich die Korrelation zwischen dem beschriebenen C/T-Polymorphismus und der GCG-Expansion reproduzieren läßt.

Der Vergleich der Ergebnisse der Kontrollgruppe und der bisher veröffentlichten Verteilung der GCG-Repeats erbrachte ebenfalls Unterschiede: so war der Genotyp 4*4 in der Kontrollgruppe signifikant häufiger vertreten als in der oben beschriebenen Studie, in der wiederum die Genotypen 4*5 und 4*6 signifikant häufiger beschrieben wurden. Diese Differenzen könnten ihre Ursache in der unterschiedlichen Methodik, einer unterschiedlichen ethnischen Verteilung oder aber in einer unterschiedlichen Verteilung des durch Forsberg et al. beschriebenen C/T-Polymorphismus finden.

So können, aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit, weitere Studien über die Verteilung des C/T-Polymorphismus und den Zusammenhang dieses Polymorphismus und der Trinukleotid-Expansion mit der Enzymaktivität der GPX-1 dazu beitragen, die Erkenntnisse über die Entstehung der sALS zu vermehren, um so kausalen Therapieansätzen für die sALS ein Stück näher zu kommen.

6 Literaturverzeichnis

1. R. Dengler, S. Zierz, F. Jerusalem: Amyotrophe Lateralsklerose, Georg Thieme Verlag Stuttgart; 1994
2. J.M. Charcot : De la sclérose latérale amyotrophique ; Prog Med 2 ; 325-327 ; 1874
3. L.M. Nelson, V. McGuire, W.T. Longstreth, C. Matkin: Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in Western Washington State. Cigarette smoking and alcohol consumption; Am J Epidemiol 151(2); 156-163; 2000
4. H. Mitsumoto, M.R. Hanson, D.A. Chad: Amyotrophic lateral sclerosis: recent advantages in pathogenesis and therapeutic approaches; Arch Neurol 45;189-202; 1988
5. L. P. Rowland: Motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis: research progress; TINS 10(10); 393-398; 1987
6. R.G. Smith, L. Siklos, M.E. Alexianu, J.I. Engelhardt, D.R. Mosier, L. Colom, A. Habib Mohamed, S.H. Appel: Autoimmunity and ALS; Neurology 47(4); 40-45; 1996
7. M.R. Ciriolo, A. De Martino, E. Lafavia, L. Rossi, M.T. Carri, G. Rotilio: Cu,Zn-superoxide dismutase dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells; J Biol Chem 275(7); 5065-5072; 2000
8. L.J. Martin: Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death; J Neuropathol Exp Neurol 58(5); 459-471; 1999
9. P.S. Spencer, A.C. Ludolph et al: Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin; Science 237(4814); 517-522; 1987
10. R. Bachus, A. Claus, T. Meyer, M. Riepe, A.C. Ludolph: Molekularbiologische Befunde bei der amyotrophen Lateralsklerose; Der Nervenarzt 68; 785-791; 1997
11. A.C. Ludolph, T. Meyer, M.W. Riepe: The role of excitotoxicity in ALS-what is the evidence ? J Neurol 247; 7-16; 2000
12. M. Dragunow, G.A. MacGibbon, P. Lawlor, N. Butterworth, B. Connor, C. Henderson, M. Walton, A. Woodgate, P. Hughes, R.L. Faull: Apoptosis, neurotrophic factors and neurodegeneration; Rev Neurosci 8(3-4); 223-265; 1997
13. B. Connor, M. Dragunow: The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain; Brain Res Brain Res Rev 27(1); 1-39; 1998
14. J.D. Rothstein, L.J. Martin, R.W. Kuncl: Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis; N Eng J Med 326(22); 1464-1468; 1992

15. R.R. Roos, T. Siddique, J.A. Trainer: Summary of SOD and free radicals in ALS and neurodegeneration conference; *Neurology* 45; 1779-1780; 1995
16. J.D. Rothstein, M. Van Kammen, A.I. Levey, L.J. Martin, R.W. Kunkl: Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis; *Ann Neurol* 38(1); 73-84; 1995
17. M. Aoki, C.L. Lin, J.D. Rothstein, B.A. Geller, B.A. Hosler, T.L. Munsat, H.R. Horvitz, R.H. Brown: Mutations in the glutamate transporter EAAT2 gene do not cause abnormal EAAT2 transcripts in amyotrophic lateral sclerosis; *Ann Neurol* 43(5); 645-653; 1998
18. T. Meyer, A. Speer, B. Meyer, W. Sitte, G. Küther, A.C. Ludolph: The glial glutamate transporter DNA in patients with amyotrophic lateral sclerosis; *Ann Neurol* 40; 456-459; 1996
19. T. Meyer, A. Fromm, C. Munch, B. Schwalenstocker, A.E. Fray, P.G. Ince, S. Stamm, G. Gron, A.C. Ludolph, P.J. Shaw: The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals; *J Neurol Sci* 170(1); 45-50; 1999
20. M. Jackson, G. Steers, P.N. Leigh, K.E. Morrison: Polymorphisms in the glutamate transporter gene EAAT2 in european ALS patients; *J Neurol* 246(12); 1140-1144; 1999
21. T.P. Obrenovitch, J. Urenjak, E. Zilkha, T.M. Jay: Excitotoxicity in neurological disorders – the glutamate paradox; *Int J Dev Neurosci* 18(2-3); 281-287; 2000
22. A.C. Ludolph, T. Meyer, M.W. Riepe: Antiglutamate therapy of ALS- wich is the next step? *J Neural Transm Suppl* 55; 79-95; 1999
23. G.C. Tsai, B. Stauch-Slusher, L. Sim, J.C. Hedreen, J.D. Rothstein, R. Kunkl, J.T. Coyle: Reductions in acidic amino acids and N-acetylaspartylglutamate in amyotrophic lateral sclerosis; *Brain Res* 556(1); 151-156; 1991
24. C. Krieger, R.A. Lanius, S.L. Pelech, C.A. Shaw: Amyotrophic lateral sclerosis: the involvement of intracellular Ca²⁺ and protein kinase C; *Trends Pharmacol Sci* 17(3); 114-120; 1996
25. J. B. Schulz, J. Lindenau, J. Seyfried, J. Dichgans: Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration; *Eur. J. Biochem* 267 (16); 4904-4911; 2000
26. F. Facchinetti, V.L. Dawson, T.M. Dawson: Free radicals as mediators of neuronal injury; *Cell Mol Neurobiol* 18(6); 667-682; 1998
27. D. J. Waggoner, T. B. Bartnikas, J.D. Gitlin: The role of copper in neurodegenerative disease; *Neurobiol Dis* 6 (4); 221-230; 1999
28. M.E. Gurney, H. Pu, A.Y. Chiu, M.C. Dal Canto, C.Y. Polchow, D.D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y.W. Kwon, H.-X. Deng, W. Chen, P. Zhai, R.L. Sufit, T. Siddique: Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu/Zn superoxide dismutase mutation; *Science* 264;1772-1775; 1994

29. M. Bogdanov, R.H. Brown, W. Matson, R. Smart, D. Hayden, H. O'Donnell, M.F. Beal, M. Cudkowicz: Increased oxidative damage to DNA in ALS patients; *Free Radical Biology and Medicine* 29(7); 652-658; 2000
30. R. G. Smith, Y.K. Henry, M.P. Mattson, S.H. Appel: Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis; *Ann Neurol* 44(4); 696-699; 1998
31. W.A. Pedersen, W. Fu, J.N. Keller, W.R. Markesbery, S. Appel, R.G. Smith, E. Kasarskis, M.P. Mattson: Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients; *Ann Neurol* 44(5); 819-824; 1998
32. H. Lovschall, M. Kassem, L. Mosekilde: Apoptosis: molecular aspects; *Nord Med* 112(8); 271-275; 1997
33. L.J. Martin, A.C. Price, A. Kaiser, A.Y. Shaikh, Z. Liu: Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death (Review); *Int J Mol Med* 5(1); 3-13; 2000
34. B.P. He, M.J. Strong: Motor neuronal death in sporadic amyotrophic lateral sclerosis is not apoptotic. A comparative study of ALS and chronic aluminium chloride neurotoxicity in New Zealand white rabbits; *Neuropathology and applied Neurobiology* 26(2); 150-160; 1999
35. R.J. Reiter, J. Cabrera, R.M. Sainz, J.C. Mayo, L.C. Manchester, D.X. Tan: Melatonin as a pharmacological agent against neuronal loss in experimental models of Huntington's disease, Alzheimer's disease and parkinsonism; *Ann N Y Sci* 890; 471-485; 1999
36. D. Liu, R. Yang, X. Yan, D.J. McAdoo: Hydroxyl radicals generated in vivo kill neurons in the rat spinal cord: electrophysiological, histological and neurochemical results; *J Neurochem* 62(1); 37-44; 1994
37. T. Siddique, D.A. Figlewicz, M.A. Pericak-Vance, J.L. Haines, G. Rouleau, A.J. Jeffers, P. Sapp, W.-Y. Hung, J. Bebout, J. McKenna-Yasek, G. Deng, H.R. Horvitz, J.F. Gusella, R.H. Brown, A.D. Roses et al.: Linkage of a gene causing amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic locus heterogeneity; *N Eng J Med* 324; 1381-1384; 1991
38. D. Liu, J. Wen, J. Liu, L. Li: The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis. Reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA and membrane phospholipids; *Faseb J* 13; 2318-2328; 1999
39. M. Jackson, A. Al-Chalabi, Z.E. Enayat, B. Chioza, P. N. Leigh, K.E. Morrison: Copper/Zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation; *Ann Neurol* 42(5); 803-807; 1997
40. H.X. Deng, A. Hentati, J.A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cayabyab, W.Y. Hung, E.D. Getzoff, P. Hu, B. Hertzfeld, R.P. Roos et al: Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase; *Science* 261(5124); 1047-1051; 1993

41. A.C. Bowling, J.B. Schulz, R.H. Brown, M.F. Beal: Superoxide dismutase activity, oxidative damage and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis; *J Neurochem* 61(6); 2322-2325; 1993
42. P.M. Andersen, P. Nilsson, L. Forsgren, S.L. Marklund: Cu/Zn-superoxide dismutase, extracellular glutathione peroxidase in blood from individuals homozygous for Asp90Ala Cu/Zn-superoxide dismutase mutation; *J Neurochem* 70; 715-720; 1998
43. R. Moumen, A. Nouvelot, D. Duval, B. Lechevalier, F. Viader: Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis; *J Neurol Sci* 151(1); 35-39; 1997
44. S. Przedborski, D.M. Donaldson, P.L. Murphy, O. Hirsch, D. Lange, A.B. Naini, D. McKenna-Yasek, R.H. Brown: Blood superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis; *Neurodegeneration* 5(1); 57-64; 1996
45. K. Fujita, M. Yamauchi, K. Shibayama, M. Ando, M. Honda, Y. Nagata: Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis; *J Neurosci Res* 45(3); 276-281; 1996
46. D. Bonnefort-Rousselot, L. Lacomblez, M.-C. Jaudon, S. Lepage et al.: Blood oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis ; *J Neurol Sci* 178(1); 57-62; 2000
47. G.F. van Landeghem, P. Tabatabaie, G. Beckmann, L. Beckmann, P.M. Andersen: Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease; *Eur J Neurol* 6(6); 639-644; 1999
48. G. McEachern, S. Kassovska-Bratinova, S. Raha, M.A. Tarnopolsky, J. Turnbull, J. Bourgeois, B. Robison: Manganese superoxide dismutase levels are elevated in a proportion of amyotrophic lateral sclerosis patient cell lines; *Biochemical and Biophysical Research Comm* 273; 2000
49. G.L. Squadrito, W.A. Pryor: Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide; *Free Radic Biol Med* 25; 4-5; 392-403; 1998
50. F. Torreilles, S. Salman-Tabcheh, M.-C. Guérin, J. Torreilles: Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite; *Brain Research Reviews* 30; 153-163; 1999
51. A.G. Estevez, N. Spear, S.M. Manuel, L. Barbeito, R. Radi, J.S. Beckman: Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture; *Prog Brain Res* 118; 269-280; 1998
52. A. H. Cross, P.T. Manning, M.K. Stern, T.P. Misko: Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination; *J Neuroimmunol* 80(1-2); 121-130; 1997
53. L.I. Bruijn, M.F. Beal, M.W. Becher, J.B. Schulz, P.C. Wong, D.L. Price, D. W. Cleveland: Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis-like diseases implicate

- tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant; *Proc Natl Acad Sci* 94(14); 7606-7611; 1997
54. J.P. Crow, J.B. Sampson, Y. Zhuang, J.A. Thompson, J.S. Beckman: Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite; *J Neurochem* 69(5); 1936-1944; 1997
55. K. Abe, L.H. Pan, M. Watanabe, H. Konno, T. Kato, Y. Itoyama: Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis; *Neurol Res* 19(2); 124-128; 1997
56. K. Abe, L.H. Pan, M. Watanabe, T. Kato, Y. Itoyama: Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis; *Neurosci Lett* 199(2); 152-154; 1995
57. H. Tohgi, T. Abe, K. Yamazaki, T. Murata, E. Ishizaki, C. Isobe: Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis; *Ann Neurol* 46(1); 129-131; 1999
58. G.F. Weber: Final common pathways in neurodegenerative diseases: regulatory role of the glutathione cycle; *Neurosci Biobehav Rev* 23(8); 1079-1086; 1999
59. J.S. Bains, C.A. Shaw: Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death; *Brain Res Brain Res Rev* 25(3); 335-358; 1997
60. M.E. Cudkowicz, P.M. Sexton, T. Ellis, D.L. Hayden, P.R. Gwilt, J. Whalen, R.H. Brown: The pharmacokinetics and pharmacodynamics of procysteine in amyotrophic lateral sclerosis; *Neurology* 52; 1492-1494; 1999
61. P. Riederer, E. Sofic, W.D. Rausch, B. Schmidt, G.P. Reynolds, K. Jellinger, M.B. Youdim: Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains; *J Neurochem* 52; 515-520; 1989
62. R.A. Lanius, C. Krieger, R. Wagey, C.A. Shaw: Increased 35S glutathione binding sites in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis; *Neurosci Lett* 163(1); 89-92; 1993
63. A. Chio, A. Cucatto, A.A. Terreni, D. Schiffer: Reduced glutathione in amyotrophic lateral sclerosis: an open, crossover, randomized trial; *Ital J Neurol Sci* 19(6); 363-366; 1998
64. S. Chada, M.M. Le Beau, L. Casey, P.E. Newburger: Isolation and chromosomal location of the human glutathione peroxidase gene; *Genomics* 6; 268-271; 1990
65. S. Apostolski, Z. Marinkovic, A. Nikolic, D. Blagojevic, M.B. Spasic, A.M. Michelson: Glutathione peroxidase in amyotrophic lateral sclerosis: the effects of selenium supplementation; *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17(3-4); 325-329; 1998
66. S. Przedborski, D. Donaldson, M. Jakowec, S.J. Kish, M. Guttman, G. Rosoklija, A.P. Hays: Brain superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in ALS; *Ann Neurol* 9; 158-165; 1996

67. P.G. Ince, P.J. Shaw, J.M. Candy et al.: Iron, selenium and glutathione peroxidase activity are elevated in sporadic motor neuron disease; *Neurosci Lett* 182; 87-90; 1994
68. M.J. Bullido, F. Valdivieso: Apolipoprotein E gene promoter polymorphisms in Alzheimer's disease; *Microsc Res Tech* 50(4); 261-267; 2000
69. L. Lannfeldt, C. Nordstedt: Genetics of Alzheimer's Disease – routes to the pathophysiology; *J Neural Transm Suppl* 59; 155-161; 2000
70. A. Al-Chalabi, Z.E. Enayat, M.C. Bakker, P.C. Sham, D.M. Ball, C.E. Shaw, C. M. Lloyd, J.F. Powell, P. N. Leigh: Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with bulbar-onset motor neuron disease; *Lancet* 347(8995); 159-160; 1996
71. C. Hayward, S. Colville, R.J. Swingle, D.J. Brock: Molecular genetic analysis of the APEX nuclease gene in amyotrophic lateral sclerosis; *Neurology* 52(9); 1899-1901; 1999
72. Z. Xu, L.C. Cork, J.W. Griffin, D.W. Cleveland: Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease; *Cell* 73; 23-33; 1993
73. J.F. Collard, F. Cote, J.P. Julien: Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis; *Nature* 375(6526); 61-64; 1995
74. D. Janet, B.S. Vechio, L.I. Bruijn, Z. Xu, R.H. Brown, D.W. Cleveland: Sequence variants in human neurofilament proteins: absence of linkage to familial ALS; *Ann Neurol* 40(4); 603-610; 1996
75. L. Stryer: *Biochemie*; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, New York; 1991
76. S.C. Harry: Slipped structures in DNA triplet repeat sequences: entropic contributions to genetic instabilities; *Biochemistry* 36(11); 3047-3049; 1997
77. C. Neri, V. Albanése, A.-S. Lebre, S. Holbert, C. Saada, L. Bougueleret, S. Meier-Ewert, I. Le Gall, P. Millasseau et al: Survey of CAG/CTG repeats in human cDNAs representing new genes: candidates for neurological disorders; *Hum Mol Genet* 5(7); 1001-1009; 1996
78. A. Abel, A. Danek, G.D. Borasio, Th.N. Witt: X-chromosomal bulbospinal neuronopathy (Kennedy-Syndrom): a disorder with repetitive triplet sequences. Case studies, differential diagnosis and molecular genetic aspects; *Nervenarzt* 67; 1011-1019; 1996
79. W.S. Watkins, M. Bamshad, L.B. Jorde: Population genetics of trinukleotide repeat polymorphism; *Hum Mol Genet* 4 (9); 1485-1491; 1995
80. S. Igarashi, Y. Tanno, O. Onodera, M. Yamazaki, S. Sato, A. Ishikawa, N. Miyatani, M. Nagashima et al.: Strong correlations between the number of CAG repeats in androgen rezeptor genes and the clinical onset of features of spinal and bulbar muscular atrophy; *Neurology* 42; 2300-2302; 1992

81. A.R. La Spada, H.L. Paulsen, K.H. Fischbeck: Trinucleotide repeat expansion in neurological disease; *Ann Neurol* 36; 814-822; 1994
82. Q. Shen, P.L. Townes, C. Padden, P.E. Newburger: An in-frame trinucleotide repeat in the coding region of the human glutathione peroxidase (GPX1) gene: in vivo polymorphism and in vitro instability; *Genomics* 23; 292-294; 1994
83. A.E.H. Emery: Population frequencies of neuromuscular diseases II. Amyotrophic lateral sclerosis (motor neurone disease); *Neuromusc Disord* 1; 323; 1991
84. J.F. Kurtzke: Risk factors in amyotrophic lateral sclerosis. In L.P. Rowland: *Advances in Neurology*, Vol. 56: Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases; Raven Press; New York; Seite 245; 1991
85. R.D. Currier, D.E. Conwill: Influenza and physical activities as possible risk factors for amyotrophic lateral sclerosis; a study of twins. In F.C. Rose, F.H. Norris; *Amyotrophic lateral sclerosis*; Smith Gordon, Nishimura; Seite 23; 1990
86. R.A. Dengler, S. Konstanzer, S. Hesse, M. Schubert, W. Wolf: Collateral nerve sprouting and twitch forces of single motor neuron units in conditions with partial denervation in man; *Neurosci Lett* 97; 118-122; 1989
87. L.P. Rowland, R. Defendini, W.H. Sherman, A. Hirano, M.R. Olarte, N. Latov, R.E. Lovelace, K. Inoue, E.F. Osserman: Macroglobulinemia with peripheral neuropathy simulating motor neuron disease; *Ann Neurol* 11; 532; 1981
88. J.M. Matés, F. Sanchez-Jiménez: Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes ; *Frontiers in Bioscience* 4; d339-345; March 15; 1999
89. D. Pearson, J. Suarez-Mendez, J.P. Day, P.F. Miller: Selenium status in relatively reduced glutathione peroxidase activity in aspirin-sensitive asthma; *Clin Exp Allergy* 14(2); 145-148; 1991
90. C. Ezeamuzie. M. Al-Hage: Effects of some anti-asthma drugs on human eosinophile superoxide anions release and degranulation; *Int Arch Allergy Immunol* 115; 162-168; 1993
91. R. Cramer, A. Faith, S. Hemmann, R. Jaussi, C. Ismail, G. Menz, K. Blaser: Human cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*; *J Exp Med* 184; 265-267; 1995
92. P. Wang, H. Chen, H. Qin, S. Sankarapandi, M.W. Becher, P.C. Wong, J.L. Zangh: Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD-1) prevents postischemic injury; *Proc Natl Acad Sci* 95; 4556-4560; 1998
93. I. Petyaev, M.J.M. Mitchinson, J. Hunt, P.J. Coussons: Superoxide dismutase antibodies purified from the human arteries and atherosclerotic lesions; *Biochem Soc J* S43; 1998
94. M.B. Mihailovic, D.M. Avramovic, I.B. Jovanovic, O.J. Pesut, D.P. Matic, V.J. Stojanov: Blood plasma selenium levels and GPX-3 activities in patients with arterial hypertension and chronic heart disease; *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17(3-4); 285-289; 1998

95. M.A. Dubick, C.L. Keen, R.A. DiSilvestro, C.D. Eskelson, J. Ireton: Antioxidant enzyme activity in human abdominal aortic aneurysmal and occlusive disease; *Proc Soc Exp Biol Med* 220(1); 39-45; 1999
96. J. Götz, C.I. va Kan, H.W. Verspaget, I. Biemond, C.B. Lamers, R.A. Veenert: Gastric mucosal superoxide dismutases in *Helicobacter pylori* infection; *Gut* 38; 502-505; 1998
97. H.P. Monteiro, E.J. Bechara, D.S. Abdalla: Free radicals involvement in neurological porphyrias and leading to poisoning; *Mol Cell Biochem* 103(1); 73-83; 1991
98. A. Seven, Y. Erbil, R. Seven, F. Inci, T. Gulyasar, B. Barutcu, G. Candan: Breast cancer and benign breast disease patients evaluated in relation to oxidative stress; *Cancer Biochem Biophys* 16(4); 333-345; 1998
99. T. Mano, R. Shinohara, K. Iwase, M. Kotake, M. Hamada, K. Uchimuro, N. Hayakawa, R. Hayashi, A. Nakai, Y. Ishizuki, A. Nagasaka: Changes in free radicals scavengers and lipid peroxide in thyroid glands of various thyroid disorders; *Horm Metab Res* 29(7); 351-354; 1997
100. S. Turi, I. Nemeth, A. Torkos, L. Saghy, I Varga, B. Matkovics, J. Nagy: Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases; *Free Radic Biol Med* 22(1-2); 161-168; 1997
101. R. Malmgren, G. Unge, O. Zetterström, H. Theorell, K. De Wahl: Lowered glutathione-peroxidase activity in asthmatic patients with food and aspirin intolerance; *DNA Cell Biol* 41; 43-45; 1986
102. A.H. Abou Ghalia, I.M. Fouad: Glutathione and its metabolizing enzymes in patients with different benign and malignant diseases; *Clin Biochem* 33(8); 657-662; 2000
103. A. Furuta, D.L. Price, C.A. Pardo, J.C. Troncoso, Z.S. Xu, N. Taniguchi: Localization of superoxide dismutase in Alzheimer's disease and Down's syndrome in substantia nigra and hippocampus; *Am J Pathol* 146; 357-367; 1995
104. D. Price, S.S. Sangram, D.R. Borchelt: theories of illness and transgenic models; *Science* 286; 1079-1083; 1998
105. D. Offen, P.M. Beart, N.S. Cheung, C.J. Pascoe, A. Hochman, S. Gorodin, E.M. Bernard, O. Bernard: Transgenic mice expressing human Bcl-2 are vulnerable to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity; *Acad Sci* 95; 5789-5794; 1998
106. C.J. Cunnings, H.Y. Zoghbi: Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases; *Hum Mol Genet* 9 (6); 909-916; 2000
107. K. Usdin, E. Grabczyk: DNA repeat expansions and human disease; *Cell Mol Life Sci* 57(6); 914-931; 2000
108. B.L. Sopher, S.B. Myrick, J.Y. Hong, A.C. Smith, A.R. La Spada: In vivo expansion of trinucleotide repeats yields plasmid and YAC constructs for targeting and transgenesis; *Gene* 261(2); 383-390; 2000

109. A.P. Lieberman, K.H. Fischbeck: Triplet repeat expansion in neuromuscular disease; *Muscle & Nerve* 23; 843-850; 2000
110. P. Baldi, S. Brunak, Y. Chauvin, A.G. Pedersen: Structural basis for triplet repeat disorders: a computational analysis; *Bioinformatics* 15(11); 918-929; 1999
111. V. Meininger: Getting the diagnosis right: beyond El Escorial; *J Neurol* 246(3); III/10-III/12; 1999
112. B.J. Traynor, M.B. Codd, B. Corr, C. Forde, E. Frost, O.M. Hardiman: Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria; *Arch Neurol* 57; 1171-1176; 2000
113. H.T. Orr, H.Y. Zoghbi: Polyglutamine tract vs. protein context in SCA1 pathogenesis. In D.C. Rubinsztein und MR. Hayden: *Analysis of triplet repeat disorders*; BIOS; Oxford; UK; 105-118; 1998
114. H. Moore, P.W. Greenwell, C.-P. Liu, N. Arnheim, T.D. Peters: Triplet repeats form secondary structures that escape DNA repair in yeast; *Proc Natl. Acad. Sci* 96(4); 1504-1509; 1999
115. R.R. Sinden: Biological implications of the DNA structures associated with disease-causing triplet repeats; *Am J Hum Genet* 64; 346-353; 1999
116. P.D. Chastain, R.R. Sinden: CTG repeats associated with human genetic disease are inherently flexible; *J Mol Biol* 275; 405-411; 1998
117. Y.-H. Wang, R. Gellibolian, M. Shimizu, R.D. Wells, J. Griffith: Long CCG triplet repeat blocks exclude nucleosomes – a possible mechanism for the nature of fragile sites in chromosomes; *J Mol Biol* 263; 511-516; 1996
118. D. Suck: DNA recognition by Dnase I ; *J Mol Recognition* 7; 65-70; 1994
119. L. Forsberg, U. de Faire, S.L. Marklund, P.M. Andersson, B. Stegmayr, R. Morgenstern: Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism i human glutathione peroxidase 1; *Blood Cells, Molecules and Diseases*; 26(5); 423-426; 2000
120. T.A. Glauser, M. Titanic-Schefft; C.E. Pippenger: Racial differences in free radical scavenging enzyme activity in children; *J Child Neurol*; 14(6); 382-387; 1999
121. E. Beutler, C. West, B. Beutler; Electrophoretic polymorphism of glutathione peroxidase; *Ann Hum Genet* 38;163-169; 1974
122. P. Meera Khan, C. Verma, L.M. Wijnen, S. Jairaj: Red cell glutathione peroxidase (GPX1) variation in Afro-Jamaican, Asiatic-Indian and Dutch population. Is the GPX 1*2 allele of “Thomas” variant an African marker? *Hum Genet* 66(4); 352-355; 19

7 Danksagung

Herrn PD Dr. Thomas Meyer, Klinik für Neurologie der Charité, danke ich ganz besonders für die Bereitschaft, als Doktorvater zu fungieren. Ganz besonders gilt mein Dank seiner Hilfestellung und Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Dr. med. Rainer Bachus, Klinik für Psychiatrie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und seine wertvollen Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. med. Reinhard Gessner, Klinik für Labormedizin und Biochemie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, und seinen Mitarbeitern – insb. Dr. med. Arne Pfeuffer - für die Unterweisung in molekularbiologischen Techniken und die Mithilfe bei der Methodenetablierung

8 Lebenslauf

Name: Hille

Vorname: Jan Matthias

Geburtsdatum: 24.06.1973

Geburtsort: Erlangen

Konfession: evangelisch

Familienstand: ledig

Eltern: Wolf-Dieter Hille†, Notar
Margarethe Hille, geb. Schneider, Apothekerin

Geschwister: Dr. Saskia Hoppe, geb. Hille, Rechtsanwältin

Schulbildung: 1979 bis 1983
Billroth-Grundschule in Nürnberg

September 1992 bis Juni 1992
Melanchthon-Gymnasium Nürnberg

Allgemeine Hochschulreife Juni 1992

Studium: Wintersemester 1992
Immatrikulation an der Hochschule des Saarlandes in
Saarbrücken im Fach Humanmedizin

Ärztliche Vorprüfung September 1995

Wintersemester 1995
Immatrikulation an der Humboldt-Universität zu Berlin

1. Ärztliche Prüfung September 1996

2. Ärztliche Prüfung September 1998

3. Ärztliche Prüfung Mai 2000

Famulaturen: März 1996
Institut für Gerichtsmedizin, Berlin

September 1996
Abteilung für Neurologie des Städtischen Klinikums, Nürnberg

	August 1997 Klinik für Herzchirurgie des Deutschen Herzzentrums, Berlin
	Februar 1998 Abteilung für Orthopädie des Krankenhauses Plau am See
Praktisches Jahr:	April 1999 bis August 1999 Abteilung für Chirurgie des Krankenhauses Am Urban, Berlin
	September 1999 bis Dezember 1999 Abteilung für Innere Medizin des Auguste-Viktoria-Krankenhauses, Berlin
	Januar 2000 bis April 2000 Department of Orthopaedic Surgery, Lenox-Hill-Hospital, New York, USA
Tätigkeit als AiP:	August 2000 bis März 2002 Ableistung des AiP im Rahmen des Wehrdienstes am Standortsanitätszentrum Potsdam als Truppenarzt derzeitiger Dienstgrad: Stabsarzt d. R.
Derzeitige Tätigkeit:	seit Mai 2002 Summer Associate bei Ernst & Young Corporate Finance Beratung GmbH, Health Sciences Team, Frankfurt am Main

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Frankfurt, im Mai 2003